



FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA
BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE FAKULTÄT

**Experimentelle Coxsackievirus B3-Infektion primärer
muriner und humaner CD19⁺ B-Lymphozyten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Nadine Jarasch
geboren am 13.10.1979 in Leipzig

Februar 2009

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Peter Wutzler (Jena)
2. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Henke (Jena)
3. Prof. Dr. med. Karin Klingel (Tübingen)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22.06.2009

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|---|
| Abb | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APAAP | Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum-Albumin |
| CAR | Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor |
| Casp | Caspase(n) |
| CD16 | Cluster of Differentiation 16 (zellulärer Fcγ-Rezeptor III) |
| CD19 | Cluster of Differentiation 19 (Differenzierungsmarker 19 an der Oberfläche von B-Zellen) |
| CD32 | Cluster of Differentiation 32 (zellulärer Fcγ-Rezeptor II) |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CTL | zytotoxische T-Lymphozyten (CD8 ⁺) |
| CVB3 | Coxsackievirus B3 |
| DAF | decay-accelerating factor |
| DCM | Dilatative Kardiomyopathie |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein (Variante des grün fluoreszierenden Proteins aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>) |
| EGTA | Ethylenglycoltetraacetat |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FITC | Fluoresceinisothiozyanat |
| GMK | green monkey kidney |
| H ₂ O | Wasser (bidestilliert und autoklaviert) |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |
| hu | human |
| i. p. | intraperitoneal |
| i. v. | intravenös |
| IKZ | Inkubationszeit |
| IRES | interne Ribosomeneintrittsstelle |

| | |
|--------------------|--|
| kDa | Kilodalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | molar (= mol/l) |
| m.o.i. | multiplicity of infection |
| MACS | magnetic-activated cell sorting |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MHC | major histocompatibility complex |
| mRNA | messenger RNA |
| mu | murin |
| MW | Mittelwert |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| nt | Nukleotide |
| NTR | nichttranslatierte Region |
| p. i. | post infectionem |
| PABP | Poly-(A)-Bindepotein |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) |
| PCBP | Poly-(rC)-Bindepotein |
| PCR | polymerase chain reaction |
| pfu | plaque forming units |
| Q-VD-OPH | Quinoline-Valin-Aspartat-(non-O-methylated)-CH ₂ -difluorophenoxy-methylketon |
| RNA | ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung |
| SDS-PAA | sodium dodecyl sulphate polyacrylamide |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis |
| TCID ₅₀ | tissue culture infectious dose (50 %) |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| WST-1 | 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazol-5-yl]-1,3-Benzol-Disulfonat |
| ZPE | zytopathischer Effekt |
| Z-VAD-FMK | Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-(O-methylated)-fluoromethylketon |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. ZIELSTELLUNG | 1 |
| 2. EINLEITUNG..... | 2 |
| 2.1 Coxsackieviren..... | 2 |
| 2.1.1 Klassifikation und Molekularbiologie..... | 3 |
| 2.1.2 CVB3-Verbreitungszyklus | 4 |
| 2.2 Einfluss einer CVB3-Infektion auf die Wirtszelle..... | 8 |
| 2.2.1 Beeinflussung zellulärer Funktionen..... | 8 |
| 2.2.2 Beeinflussung zellulärer Signalwege..... | 9 |
| 2.3 CVB3-induzierte Myokarditis und DCM..... | 10 |
| 2.3.1 Pathogenese und Immunantwort des Wirts..... | 13 |
| 2.3.2 CVB3-Infektion in Zellen des Immunsystems | 18 |
| 2.4 Apoptose..... | 20 |
| 2.4.1 Caspasen als zentrale Mediatoren der Apoptose..... | 21 |
| 2.4.2 Wege der Apoptose-Induktion..... | 23 |
| 2.4.3 Kontrolle und Regulation der Apoptose..... | 24 |
| 2.4.4 Beeinflussung apoptotischer Prozesse durch CVB3 | 25 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 28 |
| 3.1 Zellbiologische Methoden..... | 28 |
| 3.1.1 Zellen und Zellkultivierung | 28 |
| 3.1.2 Präparation von Einzelzellsuspensionen aus murinem Milzgewebe | 29 |
| 3.1.3 Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut..... | 30 |
| 3.1.4 Magnetische Zellsortierung (MACS)..... | 31 |
| 3.1.4.1 Magnetische Markierung | 31 |
| 3.1.4.2 Magnetische Sortierung..... | 31 |
| 3.1.5 Durchflusszytometrie | 32 |
| 3.1.6 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung..... | 32 |
| 3.1.7 Anti-CVB3-Seren | 33 |
| 3.1.8 Infektionsexperimente <i>in vitro</i> | 33 |
| 3.1.8.1 Vorinkubation von CVB3 mit CVB3-spezifischem Anti-Serum | 33 |
| 3.1.8.2 Vorinkubation von CVB3 mit behandeltem Anti-Serum..... | 34 |
| 3.1.8.3 Blockierung zellulärer Fcγ-Rezeptoren | 34 |
| 3.1.8.4 In vitro-Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren | 35 |
| 3.1.9 LPS-Stimulation CD19 ⁺ B-Zellen und WST-1-Proliferations-Assay | 36 |
| 3.1.10 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen..... | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 Virologische Methoden | 37 |
| 3.2.1 Virusstämme..... | 37 |
| 3.2.2 Virusvermehrung..... | 37 |
| 3.2.3 Viruskonzentrationsbestimmung | 37 |
| 3.2.3.1 Plaque-Test..... | 37 |
| 3.2.3.2 Endpunktmethode – Tissue culture infectious dose 50 % (TCID50)-Test .. | 38 |
| 3.2.4 Infectious Center Assay (ICA) | 39 |
| 3.2.5 Neutralisationstest | 39 |
| 3.2.6 Virusisolation aus Gewebe..... | 40 |
| 3.2.6.1 Mörser-Methode | 40 |
| 3.2.6.2 Mixermill-Methode | 40 |
| 3.4 Molekularbiologische Methoden | 41 |
| 3.4.1 Agarosegelelektrophorese | 41 |
| 3.4.1.1 DNA-Gele..... | 41 |
| 3.4.1.2 RNA-Gele..... | 41 |
| 3.4.2 Quantifizierung von DNA und RNA | 41 |
| 3.4.3 RT-PCR | 42 |
| 3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 42 |
| 3.4.5 Real-time PCR..... | 43 |
| 3.4.6 Plasmide | 44 |
| 3.4.7 Primer | 45 |
| 3.4.8 Restriktionsverdau von Plasmiden | 45 |
| 3.4.9 Reinigung von PCR-Produkten | 46 |
| 3.4.10 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen..... | 46 |
| 3.4.11 RNA-Isolation aus Organgewebe | 46 |
| 3.4.12 Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung | 47 |
| 3.4.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 48 |
| 3.4.14 Western Blot | 48 |
| 3.4.15 Immunhistochemie an Gefrierschnitten | 49 |
| 3.4.16 Immunhistochemische Detektion viraler Antigene – APAAP-Methode | 50 |
| 3.5 Tierexperimentelle Methoden | 52 |
| 3.5.1 Versuchstiere..... | 52 |
| 3.5.2 Infektions- und Behandlungsprotokolle | 52 |
| 3.5.3 Sektion der Versuchstiere und Organentnahme..... | 52 |

| | |
|---|------------|
| 4. ERGEBNISSE | 54 |
| 4.1 Untersuchungen zur aktiven Replikation von CVB3 in B-Lymphozyten | 54 |
| 4.1.1 CVB3-Replikation in der humanen Zelllinie Raji | 54 |
| 4.1.2 CVB3-Replikation in primären murinen CD19 ⁺ B-Zellen..... | 55 |
| 4.1.3 CVB3-Replikation in primären humanen CD19 ⁺ B-Zellen..... | 57 |
| 4.2 Untersuchungen zur Aufnahme von CVB3 in B-Lymphozyten | 58 |
| 4.2.1 Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors in B-Zellen..... | 58 |
| 4.2.1.1 CAR-Transkription | 59 |
| 4.2.1.2 CAR-Translation..... | 60 |
| 4.2.2 Steigerung der CVB3-Infektiösität durch virusspezifisches Serum | 61 |
| 4.2.2.1 Nachweis der Beteiligung virusspezifischer Antikörpern an der gesteiger- | |
| ten CVB3-Infektiösität für murine CD19 ⁺ B-Zellen | 64 |
| 4.2.2.2 Neutralisierende Eigenschaft des murinen Anti-CVB3-Serums..... | 67 |
| 4.2.2.3 Beteiligung zellulärer Fcγ-Rezeptoren an der gesteigerten CVB3-Infek- | |
| tiösität für murine CD19 ⁺ B-Zellen | 69 |
| 4.2.2.4 Beteiligung des Komplementsystems an der gesteigerten CVB3-Infek- | |
| tiösität für murine CD19 ⁺ B-Zellen | 72 |
| 4.3 Untersuchungen zur Infektion CD19⁺ B-Lymphozyten <i>in vivo</i>..... | 74 |
| 4.3.1 Verteilung CD19 ⁺ B-Zellen in CVB3-infizierten Geweben der Maus | 74 |
| 4.3.2 CVB3-Infektion muriner CD19 ⁺ B-Zellen <i>in vivo</i> | 76 |
| 4.3.3 Einfluss CVB3-spezifischer Antikörper auf <i>in vivo</i> infizierte CD19 ⁺ B-Zellen..... | 78 |
| 4.3.4 Stimulation CD19 ⁺ B-Zellen durch Lipopolysaccharid..... | 84 |
| 4.4 Untersuchungen apoptotischer Prozesse in CVB3-infizierten CD19⁺ B-Lym- | |
| phozyten | 88 |
| 4.4.1 Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf die CVB3-Replikation <i>in vitro</i> | 88 |
| 4.4.2 Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf die virale Translation | 94 |
| 4.4.3 <i>In vivo</i> -Applikation von Caspase-Inhibitoren..... | 97 |
| 4.4.3.1 Einfluss auf die Viruslast in murinen Geweben | 97 |
| 4.4.3.2 Einfluss auf CVB3-infizierte CD19 ⁺ B-Lymphozyten des Milzgewebes | 98 |
| 5. DISKUSSION | 101 |
| 5.1 Aktive Replikation von CVB3 in primären murinen und humanen CD19⁺ B- | |
| Lymphozyten | 102 |
| 5.2 Aufnahme von CVB3 in CD19⁺ B-Lymphozyten | 105 |
| 5.2.1 Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors..... | 105 |
| 5.2.2 Antikörper-vermittelte CVB3-Aufnahme in murine und humane CD19 ⁺ | |
| B-Zellen | 107 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.3 Bedeutung zellulärer Fc γ -Rezeptoren | 115 |
| 5.2.4. Bedeutung des Komplementsystems | 118 |
| 5.3 CVB3-Infektion muriner CD19⁺ B-Zellen <i>in vivo</i> | 120 |
| 5.3.1 Anteil empfänglicher CD19 ⁺ B-Zellen im murinen Milzgewebe | 120 |
| 5.3.2 CVB3-spezifische Antikörper <i>in vivo</i> | 123 |
| 5.3.3 Einfluss des Zellaktivierungsstatus auf die Infektion CD19 ⁺ B-Zellen mit CVB3 | 125 |
| 5.4 Apoptose in CVB3-infizierten murinen und humanen CD19⁺ B-Zellen | 127 |
| 5.4.1 Einfluss von Pan-Caspase-Inhibitoren <i>in vitro</i> | 127 |
| 5.4.2 <i>In vivo</i> -Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren | 132 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 135 |
| 7. LITERATUR | 137 |

1. ZIELSTELLUNG

Das humanpathogene Coxsackievirus B3 (CVB3), als ein Vertreter der Familie *Picornaviridae*, wird heute aufgrund epidemiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen als einer der häufigsten Erreger viraler Herzerkrankungen eingestuft. Dabei treten vor allem Myokarditiden auf, in deren Folge es zu einer Fibrosierung des Myokards und als Spätkomplikation zur Entwicklung einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) kommen kann. Die Bedeutung dieser Infektionen wird dabei in ihrer Häufigkeit deutlich: Intensive Analysen ergaben, dass Coxsackie B-Viren, zusammen mit anderen Enteroviren, in etwa 50 % der akuten Myokarditiden und in 25 % der DCM-Fälle involviert sind [109]. Um eine effektive, virusspezifische Therapie- oder Präventionsstrategie entwickeln zu können, ist ein genaueres Verständnis der diesen Erkrankungen zugrunde liegenden Pathogenese-Mechanismen unabdingbar. Ein dabei bis heute weitestgehend unverstandener Aspekt ist die Interaktion von CVB3 mit dem Immunsystem des Wirtsorganismus. Durch einige wenige Studien am murinen Modell der virusinduzierten Myokarditis ist bekannt, dass sich CVB3 nicht nur in primären Zielorganen wie Herz oder Pankreas vermehrt, sondern dass es auch zu einer Infektion verschiedener Immunzellen kommt, wobei vor allem B-Zellen des Milzgewebes ein Target darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Infektion dieser Lymphozyten durch CVB3 und dabei stattfindende Mechanismen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, näher zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Aufklärung des bisher nur wenig untersuchten pathogenetischen Aspekts der viralen Interaktion mit Zellen des Immunsystems zu leisten. Dabei sollten die folgenden Fragestellungen, unter Verwendung CD19⁺ B-Lymphozyten aus murinem Milzgewebe, bearbeitet und in ausgewählten Bereichen zusätzlich auch für primäre humane CD19⁺ B-Zellen des peripheren Blutes untersucht werden:

- Sind murine und humane CD19⁺ B-Zellen empfänglich für CVB3 und findet nach der Infektion eine aktive virale Replikation in diesen Lymphozyten statt?
- Welcher Viruseintrittsmechanismus liegt einer Infektion CD19⁺ B-Zellen zugrunde?
- Ist die Vermehrung von CVB3 in CD19⁺ B-Lymphozyten assoziiert mit apoptotischen Prozessen?
- Werden auch unter *In vivo*-Bedingungen murine CD19⁺ B-Lymphozyten infiziert und wie hoch ist dabei der Anteil an CVB3-empfindlichen Zellen?
- Wie wirkt sich eine B-Zell-Aktivierung auf deren Suszeptibilität für CVB3 aus?
- Welchen Einfluss hat eine *In vivo*-Applikation von Caspase-Inhibitoren auf die Infektion von murinen CD19⁺ B-Lymphozyten?

2. EINLEITUNG

2.1 Coxsackieviren

Die aufgrund zahlreicher polioähnlicher Krankheitsfälle mit Symptomen wie Paralyse oder Myalgie zunächst als Parapolioviren bezeichneten Pathogene wurden erstmals 1948 durch Dalldorf und Sickles beschrieben und isoliert [58]. Da eine Neutralisation durch Antiseren gegen Poliovirus jedoch nicht möglich war und es Dalldorf gelang, erregerrhaltiges Stuhlmaterial eines erkrankten Jungen mit schlaffen Lähmungen auf neugeborene Mäuse zu übertragen und so schwerwiegende Paralysen auszulösen, wurden diese Isolate später einer neuen Virusgruppe zugeordnet. Entsprechend dem Ort ihrer Erstbeschreibung erfolgte die Namensgebung nach der amerikanischen Kleinstadt Coxsackie im Bundesstaat New York [228]. Die ubiquitär vorkommenden humanpathogenen Coxsackieviren (CV) werden aufgrund unterschiedlicher histologischer Befunde nach einer Übertragung auf neugeborene Mäuse in zwei Gruppen unterteilt [57]. Während die 23 Serotypen der Gruppe-A-Coxsackieviren (CVA), zu denen auch das Erstisolat zählt, eine generalisierte Myositis mit schlaffen Lähmungen ohne ZNS-Beteiligung verursachen, infizieren die 6 Serotypen der Gruppe B (CVB) murine Gewebe und Organe wie Pankreas, Herz, Gehirn oder Lunge ausschließlich herdartig begrenzt.

Die erste Isolierung eines solchen Coxsackie-B-Virus erfolgte im Jahre 1949 von einem Patienten mit aseptischer Meningitis [230]. Aufgrund ihrer Säurestabilität, d. h. einer Resistenz gegenüber Diethylethern und pH-Werten < 3 , können die Erreger fäkal-oral durch Schmutz- und Schmierinfektion sowie verunreinigtes Trinkwasser übertragen werden und gelangen anschließend durch eine Virämie zu den verschiedenen Zielorganen. In etwa 20 % der Fälle treten klinisch manifeste Krankheitssymptome auf [337]. Das breite Spektrum dieser humanen CV-Infektionen reicht dabei von leichten Erkrankungen des Respirationstraktes über fiebrige grippeähnliche Symptome und Durchfallerscheinungen bis hin zu schwerwiegenden akuten und chronischen Krankheitsbildern, wie aseptische Meningitis, Enzephalitis, Myokarditis, Pankreatitis und Hepatitis, die z. T. fulminant verlaufen und letal enden können [49, 231, 236, 247, 354, 362, 363]. Bis heute umstritten ist allerdings die Rolle von CVB bei Krankheitsbildern, wie chronischem Müdigkeitssyndrom [23] und Juvenile Diabetes Mellitus [42, 93, 166, 316, 374, 375]. Der Schweregrad der jeweiligen Erkrankung wird vermutlich von mehreren entscheidenden Faktoren beeinflusst. Zum einen spielen Immunstatus [32], genetischer Hintergrund sowie das Geschlecht des Patienten [265] und zum anderen die Virulenz des jeweiligen Virusstammes [38, 338] eine Rolle. Ein und derselbe Virustyp kann vermutlich aufgrund der hohen Mutationsrate des viralen Genoms in Virulenz und Gewebe-Tropismus variieren und so eine Vielzahl von Sympto-

men verursachen [173]. Zusätzlich ist das Alter des Betroffenen ein Kriterium für Verlauf und Schwere einer Coxsackievirus-Infektion (siehe 2.3).

2.1.1 Klassifikation und Molekularbiologie

Ausgehend von Sequenz- und molekularbiologischen Analysen werden CV heute taxonomisch in die Familie der *Picornaviridae* eingeordnet, innerhalb der sie zum Genus *Enterovirus* gehören und darunter als Humane Enteroviren B bezeichnet werden. Weitere prominente Vertreter dieses Genus sind die Rhinoviren, welche akute Infektionen des Respirationstraktes verursachen und die Erreger der Poliomyelitis – die Polioviren. Daneben umfassen die Picornaviren sieben andere Genera – *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus* – und weitere fünf Gattungen werden derzeit dem Internationalen Komitee für Virustaxonomie durch die „Picornaviridae Study Group“ zur Eingliederung in diese Familie vorgeschlagen – *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus*, *Avihepatovirus* sowie ein noch unbenanntes Genus (voraussichtlich als *Phocovirus* bezeichnet) (Abb. 1).

Wie die anderen Vertreter der *Picornaviridae* sind CV ca. 25-30 nm groß und zählen damit zu den kleinsten bekannten Viren (*pico*- = griech. klein). Das unbehüllte Nukleokapsid,

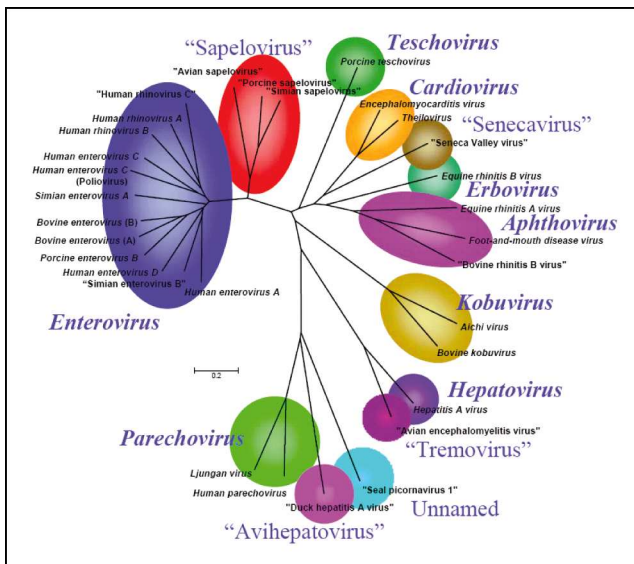


Abb. 1: Taxonomische Einteilung der *Picornaviridae*. Fünf der 13 dargestellten Gattungen (in Anführungszeichen) werden derzeit dem Internationalen Komitee für Virustaxonomie durch die „Picornaviridae Study Group“ zur Eingliederung vorgeschlagen. (www.picornastudygroup.com)

das der Form nach einem pentagonalen Dodekaeder mit Ikosaedersymmetrie gleicht (Abb. 2), besteht aus 60 Protomeren in regelmäßiger Anordnung, welche wiederum jeweils aus den vier Strukturproteinen VP1-VP4 bestehen. Fünf dieser Protomere assoziieren während der Virusreifung zu einem Pentamer, an dessen Symmetrieachse, d. h. an der Stelle, wo die jeweiligen VP1-Proteine aufeinander treffen, sich eine als „Canyon“ bezeichnete kreisförmige Vertiefung befindet, welche die Interaktion mit den zellulären Rezeptormolekülen vermittelt [237, 274, 275].

Während VP1-VP3 die Oberfläche des Kapsids bilden und für neutralisierende Antikörper des Wirts zugänglich sind, ist VP4 im Inneren des Viruspartikels mit der einzelsträngig

vorliegenden viralen RNA assoziiert. Diese umfasst bei Coxsackievirus B3 (CVB3) 7400 nt und ist aufgrund ihrer Plusstrang-Orientierung *per se* infektiös – kann also kurz nach dem Eintritt in die Zellen als mRNA genutzt und translatiert werden. Allerdings ist die Infektiosität bloßer RNA um den Faktor 10^6 geringer als die eines intakten Viruspartikels. Der einzelne offene Leserahmen kodiert für ein ca. 250 kDa großes Polyprotein mit 2185

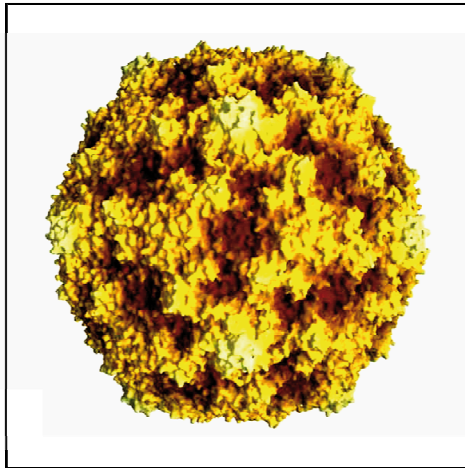


Abb. 2: 3D-Kristall-Struktur CVB3.
[237]

Aminosäuren, welches co- und posttranslational durch virale Proteasen bzw. autokatalytisch in 11 Proteine prozessiert wird. Zudem ist die virale RNA 3'-terminal polyadenyliert und am 5'-Ende kovalent mit einem kleinen hydrophoben Protein, dem VPg (virales Protein, genomassoziiert; 3B-Peptid) verbunden, welches eine initierende Rolle bei der viralen Transkription übernimmt. Flankiert wird der kodierende Bereich jeweils am 5'- und 3'-Ende von nichttranslatierten Regionen (5'- bzw. 3'-NTR), die die Fähigkeit zur Ausbildung von spezifischen RNA-Sekundärstrukturen durch intramolekulare

Basenpaarung besitzen und Protein-RNA-Interaktionen ermöglichen. Die innerhalb der Enteroviren hochkonservierte 5'-NTR beinhaltet Signalstrukturen zur Translations- und Replikationsinitiation und bildet bei CV sieben Domänen aus. Domäne I weist die Form eines Kleeblattes auf und wird daher als „cloverleaf“ bezeichnet. Die stromaufwärts liegenden Sekundärstrukturen (Domänen II-VII) haben die Funktion einer „internen Ribosomen-Eintrittsstelle“ (IRES) [164, 260, 261].

2.1.2 CVB3-Vermehrungszyklus

Um eine produktive Infektion einer suszeptiblen Wirtszelle zu initiieren, binden Viruspartikel, vermittelt durch die Canyon-Struktur im viralen Kapsid [275], in der Regel an zelluläre Oberflächenmoleküle, um anschließend durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzellen einzudringen. Als Corezeptoren dienen dabei für einige CVB3-Serotypen sogenannte „accessory factors“ wie der „decay-accelerating factor“ (DAF/CD55) [20, 299] oder verschiedene modifizierte Heparan-Sulfate [382, 383]. Sie tragen entweder zur Konzentration des Virus auf der Zelloberfläche bei oder ermöglichen die Interaktion mit anderen Rezeptorstrukturen, die dann das Eindringen der Viren ins Innere der Zelle vermitteln. Das für den Eintritt von allen sechs Coxsackie-B-Serotypen identifizierte Rezeptormolekül ist ein 46 kDa großes Protein der Immunglobulinsuperfamilie. Es wird aufgrund seiner

analogen Bedeutung bei Adenoviren (Typen: A, S, D, E und F) als Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet [18, 19, 272, 300, 334] und ist als Transmembrankomponente der Zonulae occludentes (parazelluläre Diffusionsbarriere/„tight junctions“) von Epithelzellen schlecht zugänglich für das Virus [50]. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass der initiale Kontakt viraler Partikel zum apikal lokalisierten DAF eine von diesem Molekül ausgehende intrazelluläre Signalkaskade auslöst, die zur Polymerisation von Aktin und damit zu Umlagerungsprozessen im Zytoskelett sowie zur Phosphorylierung von Caveolin-1 führt. Dies ermöglicht einen Transport des Virus-DAF-Komplexes in den Bereich der „tight junctions“ sowie die Bindung an CAR und letztlich die Internalisierung der Viruspartikel in endozytotische Vesikel [53, 302]. Das Verteilungsmuster von CAR ist zudem spezies-, gewebs- und altersabhängig und erklärt somit zumindest teilweise den coxsackieviralen Wirts- und Organtropismus [162, 239, 248, 333]. Überdies werden neben CAR und DAF mindestens fünf weitere Proteine auf humanen Myozyten vermutet, die als Rezeptoren für CVB3 dienen könnten [256]. Eine weitere CAR-unabhängige Möglichkeit für den Eintritt infektiöser coxsackieviraler Partikel könnte durch virusspezifische Antikörper vermittelt werden [140]. Ausschließlich nach Bindung infektiöser Partikel an CAR kommt es zu einer Konformationsänderung im viralen Kapsid, was die Penetration der Wirtszelle und ein Entlassen der viralen RNA ins Zytoplasma zur Folge hat. Im Gegensatz dazu ist der Corezeptor DAF nicht in der Lage, diese Veränderungen und somit das „uncoating“ auszulösen [142, 233].

Aufgrund der fehlenden 7-Methylguanosin-*cap*-Struktur, die beim Großteil der zellulären mRNA-Moleküle für eine korrekte Translationsinitiation nötig ist, erfolgt die sich unmittelbar anschließende Translation des viralen Plusstrang-RNA-Genoms *cap*-unabhängig, indem der eukaryotische Translationsinitiationskomplex, bestehend aus der kleinen 40S-Untereinheit, einer Initiator-tRNA und verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren, im Bereich der IRES-Struktur an die virale RNA bindet. Diese Strategie wurde auch für einige zelluläre mRNAs nachgewiesen, die ebenso IRES-Elemente statt einer *cap*-Struktur aufweisen [127]. Das entstehende virale Polyprotein wird während und nach seiner Synthese mit einem hohen Grad an Präzision durch die viralen Proteasen 2A^{pro}, 3C^{pro} und 3CD^{pro} zu funktionsfähigen Proteinen prozessiert (Abb. 3). Zuerst erfolgt die Spaltung dieses Vorläuferproteins in drei große Bereiche (P1-3): Während die P1-Region für die vier Strukturproteine des viralen Kapsids (VP1-4 bzw. 1A-D) kodiert, entstehen sowohl aus dem mittleren P2-Teil als auch aus der carboxyterminalen Region P3 als Endprodukte die Nichtstrukturproteine 2A, 2B, 2C und 3A, 3B, 3C, 3D.

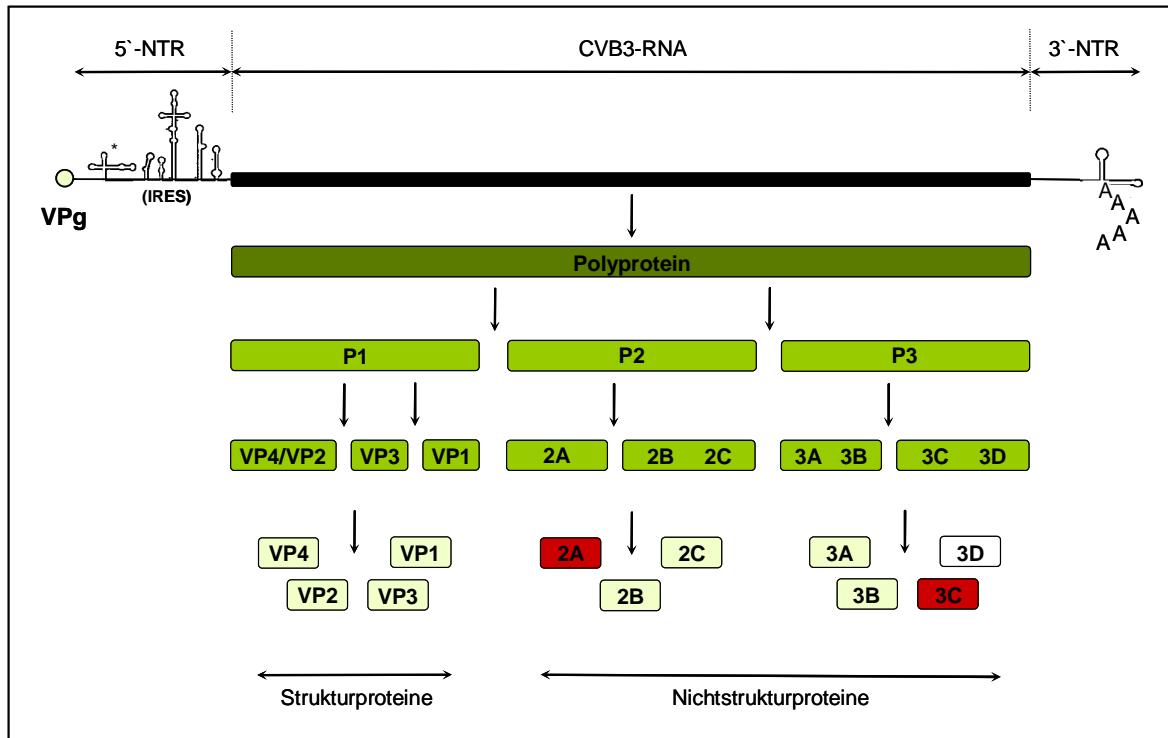


Abb. 3: Enterovirale Polyproteinprozessierung. Das virale Plusstrang-RNA-Genom, welches am 5'- und 3'-Ende durch nichttranslatierte Regionen (5'-/3'-NTR) gekennzeichnet ist, wird in ein Polyprotein translatiert, das anschließend durch die viralen Proteasen 2A und 3C (rot) prozessiert wird. Zunächst erfolgt eine Spaltung in die Vorläuferproteine P1, P2 und P3, wobei P1 für die Strukturproteine kodiert und P2/P3 Nichtstrukturproteine, wie die 3D-Polymerase (weiß), umfassen. (IRES = „interne Ribosomen-Eintrittsstelle“; VP = Virusprotein)

Während dieser Prozessierung entstehen jedoch auch Vorläuferpeptide, die sich in ihrer Funktion von den reifen Proteinen unterscheiden und zudem multifunktionell sind [362]. So ist z. B. das 3CD-Protein, welches proteolytische Aktivität besitzt und zudem als Voraussetzung für die Replikation an die virale RNA bindet, eine Vorstufe für die 3C-Protease und das 3D-Protein. Letzteres vermittelt als RNA-abhängige RNA-Polymerase ($3D^{pol}$) zusammen mit anderen viralen und zellulären Proteinen die Replikation des viralen Genoms, welche im Zytoplasma der Wirtszelle an Membrankompartimenten stattfindet. Dabei wird zunächst während der Translation entstandenes VPg (3B) mit zwei Uridinresten versehen (VPg-pUpU). Nach dieser Uridinylierung assoziiert VPg-pUpU mit der 3'-Poly-A-Region und dient dort als Primerkomplex, an dessen freiem 3'-OH-Ende ein komplementärer Negativstrang synthetisiert wird. Eingeleitet wird dieser Vorgang durch die Bildung eines Ribonukleoproteinkomplexes (RNP) am 5'-Ende der viralen RNA, wobei 3CD und das zelluläre Poly-(rC)-Bindepotein 2 (PCBP2) an das „cloverleaf“ der 5'-NTR binden. Zudem interagiert dieser Komplex mit einem weiteren Wirtszellprotein, dem Poly-(A)-Bindepotein (PABP), welches an das 3'-Ende des gleichen RNA-Moleküls gebunden hat. Durch diesen Kontakt kommt es zur Zirkularisierung des Genoms und zur Initiation der Negativstrang-Synthese. Dabei entsteht ein kurzlebiges doppelsträngiges RNA-

Zwischenprodukt, das durch die an das 3'-Ende des Minusstrangs gebundenen viralen Proteine 2C und 2BC getrennt wird. Mit Hilfe der 2C-Helikaseaktivität wird die intramolekulare RNA-Duplex-Struktur getrennt, wobei gleichzeitig zwei terminale Adenosinreste am 3'-Ende des Negativstrangs freigelegt werden. Dadurch ist eine Anlagerung von VPg-pUpU möglich, und der Minusstrang dient als Matrize für die 3D^{pol}-vermittelte Synthese neuer Virusgenome [27]. An einer einzelnen Negativstrang-RNA können mehrere Positivstränge entstehen, so dass das Verhältnis von Plus- zu Minus-RNA-Strängen zwischen 30:1 bis 50:1 liegt [249]. Ähnlich wie andere RNA-Polymerasen baut auch die 3D^{pol} während eines Replikationsvorganges ca. 1-2 falsche Nukleotide in den entstehenden RNA-Strang ein, was eine rasche Mutation der Viren und die Entstehung neuer Stämme zur Folge haben kann [71, 356].

Ein Umschalten von viralen Translationsprozessen auf die Virusreplikation im Zytoplasma der Wirtszelle kommt durch die Konkurrenz beider Vorgänge um das zelluläre Protein PCBP2 zustande. Während für einen korrekten Ablauf der Virusproteinsynthese PCBP2 an die Domäne IV der IRES gebunden sein muss, wird eine Interaktion dieses Proteins mit der Domäne I durch den Kontakt von 3CD mit der „cloverleaf“-Struktur gefördert, was zur Initiation der viralen Replikation führt. PCBP2 bindet demnach weniger an die Domäne IV, und die Translationsprozesse werden gehemmt. Von den neuen Positiv-RNA-Strängen werden wiederum virale Polyproteine translatiert. Sind virale Proteine und genomische RNA in ausreichender Menge vorhanden, entstehen reife infektiöse Viruspartikel durch „self assembly“. Für das Entstehen der Ikosaederecken werden zunächst die Pentamere gebildet, die aus je fünf VP0/VP3/VP1-Komplexen bestehen. Anschließend bildet sich ein Kapsidvorläufer durch die Zusammenlagerung von 12 Pentameren, der die virale Positivstrang-RNA einschließt. Kim et al. konnten zudem am murinen Modell der CVB3-induzierten Myokarditis sowie durch Zellkulturpassagen zeigen, dass unter bestimmten experimentellen Bedingungen auch 5'-trunkierte Minus-Strang-RNA-Moleküle in virale Kapside verpackt werden [179, 180]. Nach der Enkapsidierung der viralen RNA tritt das Vorläuferprotein VP0 in Kontakt zum Genom und es kommt zur Reifung des Kapsids, indem VP0 autokatalytisch in VP2 und VP4 gespalten wird. Durch eine 2B-vermittelte Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität, die vorwiegend aufgrund einer Zunahme der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration zustande kommt [67, 345], erfolgt anschließend die endgültige Freisetzung der fertigen Virionen infolge einer Lyse der Wirtszelle. Am Ende eines Reproduktionszyklus entsteht so in einer einzigen zytolytisch geschädigten Zelle aus einem infektiösen Viruspartikel eine Nachkommenschaft von 10⁴-10⁵ neuen Viren.

2.2 Einfluss einer CVB3-Infektion auf die Wirtszelle

Die viralen Replikations- und Translationsvorgänge und insbesondere ein Teil der entstehenden Virusproteine beeinflussen die Stoffwechselvorgänge sowie die Morphologie der Wirtszelle beträchtlich. Die viralen Mechanismen zielen dabei zum einen auf die Förderung der Produktion neuer infektiöser Viruspartikel und zum anderen auf eine Hemmung von Prozessen und Komponenten des Wirtsorganismus, die den viralen Lebenszyklus negativ beeinflussen z. B. das Immunsystem [362]. Zudem hat CVB3, wie andere Viren auch, verschiedene Strategien entwickelt, die befallene Wirtszelle so zu manipulieren, dass zu Beginn des viralen Lebenszyklus Signalwege, die ein Überleben der Zelle sichern, initiiert werden und es im Gegensatz dazu in der Spätphase, d. h. wenn die Menge an reifen infektiösen Viruspartikeln hoch ist, zur Induktion von Anti-Überlebens- bzw. apoptotischen Prozessen kommt (siehe 2.4.4), die eine Freisetzung der Viren erleichtert bzw. ermöglicht [76].

2.2.1 Beeinflussung zellulärer Funktionen

Während der Virusvermehrung kommt es in den infizierten Wirtszellen zum sogenannten „host cell shut-off“ – d. h. dem Abschalten der zellulären Translations-, Transkriptions- und Stoffwechselprozesse. Bereits kurze Zeit nach dem Eindringen von CVB3 in die Wirtszelle liegen große Mengen an viraler RNA im Zytoplasma vor, deren IRES-Strukturen eine hohe Affinität zu zellulären Ribosomen und Proteinen wie PCBP2 und PABP aufweisen. Zudem werden die funktionell homologen eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4G/I und eIF4GII durch die virale Protease 2A^{pro} gespalten, was die Bindung der 40S ribosomalen Untereinheit und somit eine *cap*-abhängige Translation zellulärer mRNAs verhindert [79]. Ein Spaltprodukt dieser Prozessierung bindet dann an die virale RNA und fördert wiederum die IRES-abhängige Translation des viralen Polyproteins [252]. Zusätzlich wird das an der Translationsinitiation beteiligte PABP sowohl durch die 2A^{pro} als auch durch die 3C^{pro} gespalten [170]. Das Zusammenspiel dieser Prozesse bewirkt, dass die Translationsmaschinerie der Wirtszelle ausschließlich virale Proteine synthetisiert.

Daneben wird auch die zelluläre Transkription stark durch die enterovirale Infektion und dabei insbesondere durch die proteolytische Aktivität der viralen Protease 3C^{pro} beeinträchtigt. Durch ein Signalpeptid im 3D-Teil des 3CD-Vorläuferproteins wird dieses in den Zellkern transportiert [301, 358], wo es zur autokatalytischen Spaltung und anschließend zur 3C^{pro}-vermittelten Spaltung des TATA-Bindeproteins [47] sowie der Transkriptionsfaktoren TFIIC [46], CREB [371] und Oct-1 [373] kommt. Daraus resultiert eine Inhibierung der zellulären Transkription durch alle drei eukaryotischen RNA-Polymerasen [372]. Das coxsackievirale 2B-Protein erhöht zudem die Permeabilität der Plasmamembran sowie die

der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und beeinträchtigt zusammen mit dem 3A-Protein Transport und Sekretion von Wirtszellproteinen [28, 345]. So wird z. B. die Expression von „major histocompatibility complex“- (MHC-) I-Molekülen auf der Zelloberfläche durch eine CVB3-Infektion drastisch reduziert, was die Ausbildung einer antiviralen T-Zell-vermittelten Immunantwort erschwert [52]. Eine erhebliche Beeinträchtigung der Zellmorphologie entsteht zum einen infolge der Spaltung des Zytoskelettproteins Dystrophin durch 2A^{pro} und der Zerstörung der Dystrophin-assoziierten Glykoproteine α -Sarkoglykan und β -Dystroglykan, was im infizierten Herzgewebe zu einer fortschreitenden myokardialen Schädigung und im weiteren Verlauf zur Ausbildung einer DCM führen kann [11], und zum anderen durch die Spaltung eines Mikrotubuli-assoziierten Proteins [169]. Der zelluläre „shut-off“ äußert sich durch zunehmende Vakuolisierung des Zytoplasmas, Kondensation des Chromatins und Schrumpfen des Zellkerns [56, 384]. Weiterhin werden die Chromosomen durch Brüche geschädigt [13, 112], das ER verändert seine Struktur [66] und in der Spätphase der Infektion kommt es zur Zerstörung der Mikrotubuli. Dieser zytopathische Effekt (ZPE), den die meisten Picornaviren hervorrufen, ist durch ein im Lichtmikroskop beobachtbares Zusammenziehen sowie Abrunden der Zellen und der daraus resultierenden Auflösung des Zellverbandes gekennzeichnet.

2.2.2 Beeinflussung zellulärer Signalwege

Signaltransduktionswege ermöglichen einer Zelle, extra- und intrazelluläre Veränderungen wahrzunehmen, umzuwandeln und in geeigneter Weise auf diese weitergeleiteten Signale zu reagieren. An den dabei zumeist kaskadenartig ablaufenden Reaktionsketten sind eine Vielzahl von Proteinen mit enzymantischer Aktivität beteiligt. CVB3 ist in der Lage, eine Reihe solcher Signalwege zu induzieren bzw. zu manipulieren, um ein vorübergehendes Überleben der infizierten Zellen zu sichern und so eine effektive Virusreplikation zu gewährleisten. Erst in den letzten Jahren wurde jedoch die Untersuchung solcher Signaltransduktionswege in der Pathogenese enteroviraler Myokarditiden verstärkt berücksichtigt. In vielen Fällen konnte dabei gezeigt werden, dass nach einer Infektion mit CVB3 verschiedenste Proteine phosphoryliert werden. 1997 wurde erstmals in infizierten HeLa-Zellen eine Phosphorylierung an Tyrosinresten zweier Proteine beschrieben, deren Inhibierung zur drastischen Reduktion der Virustiter führte [149]. Nähere Untersuchungen ergaben, dass infolge einer CVB3-Infektion von HeLa-Zellen das p21^{ras} GTPase-aktivierende Protein (RasGAP) gespalten wird, was wiederum zur Phosphorylierung der zwei MAP („mitogen-activated protein“)-Kinasen ERK-1 und ERK-2 (= „extracellular signal-related kinases“) über einen Raf1/MEK-1-abhängigen Signalweg führt [150]. In weiteren *In vitro*- und *In vivo*-Studien konnte die Bedeutung dieser phosphorylierten MAPK für

die CVB3-Replikation bestätigt werden [54, 205, 212, 254]. Zudem wurde eine gesteigerte Phosphorylierung der Kinasen JNK1/2 („stress-activated protein kinases“) und der p38 MAP-Kinase festgestellt. Eine Inhibierung letzterer bewirkte eine Reduktion der Viruspartikelfreisetzung und eine Pro-Caspase-3-Spaltung verbunden mit Apoptoseinduktion in den Wirtszellen [304]. Eine weitere wichtige Kinase, die während einer CVB3-Infektion in HeLa-Zellen und Kardiomyozyten an zwei Aminosäuren – Serin und Threonin – phosphoryliert und damit aktiviert wird, ist die Proteinkinase B (= Akt), welche eine zentrale Rolle in der Homöostase der Zelle spielt [75] und u. a. die Caspase 9 verstärkt phosphoryliert [386]. Vertiefende *In vitro*-Studien zeigten zudem, dass die virusinduzierte Aktivierung von Akt über einen Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-abhängigen Signalweg stattfindet, dessen Inhibierung zu einer starken Reduktion der coxsackieviralen RNA-Synthese und Replikation führt [77]. Eines der Effektormoleküle, die über den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert werden, ist der Transkriptionsfaktor NF κ -B („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer“-B), der eine große Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose besitzt. Eine solche PI3K/Akt-abhängige Aktivierung von NF κ -B sowie eine daraus resultierende Aufrechterhaltung der Zellvitalität konnte auch in CVB3-infizierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden [74]. Zudem scheint die Ubiquitylierung verschiedener zellulärer und viraler Proteine und deren Prozessierung über den Ubiquitin/Proteasom-Weg eine Rolle während der CVB3-Replikation zu spielen [213, 214, 303, 305, 306]. Eine weitere wichtige coxsackievirale Strategie, um optimale Vermehrungs- und Ausbreitungsbedingungen zu schaffen, ist die Induktion bzw. Manipulation apoptotischer Signalwege.

2.3 CVB3-induzierte Myokarditis und DCM

Das Krankheitsbild der Myokarditis wird durch einen sich herdförmig oder diffus im Myokard ausbreitenden Entzündungsprozess bestimmt, der akut bzw. chronisch rezidivierend verläuft und dabei sowohl die Myozyten und das Interstitium als auch die myokardialen Gefäße einbezieht. Induziert wird diese Entzündung durch das direkte oder indirekte Einwirken von Erregern wie Bakterien, Pilzen, Viren oder Protozoen (Mittel- und Südamerika: *Trypanosoma cruzi*), wobei in diesen Fällen von einer infektiösen Myokarditis gesprochen wird. Des Weiteren kann eine Herzmuskelentzündung durch System- und Stoffwechselerkrankungen sowie chemische (Toxine) und physikalische (Röntgenstrahlung) Agenzien entstehen – diese Myokarditiden werden dann als nichtinfektiös bezeichnet. Nach dem Rückgang von bakteriell verursachten Infektionskrankheiten sind in Europa und den USA heute Viren als Hauptursache für die Entwicklung einer akuten Myokarditis zu sehen. Obwohl zahlreiche kardiotope Viren, wie Herpesviren, Adenoviren oder Orthomyxoviren, als

Erreger prinzipiell in Betracht kommen, werden aufgrund epidemiologischer Untersuchungen Enteroviren und im Speziellen CV der Gruppe B (B3) als die häufigsten Erreger einer viralen Myokarditis eingestuft. Weiterhin werden Coxsackie-A-Viren und Echoviren als kardiotrop beschrieben, wobei die Inzidenz für diese beiden Gruppen im Gegensatz zu 3,5 % für CVB bei 0,7 % liegt [109]. In 1,5 % aller Fälle treten kardiovaskuläre Symptome auf. Serologische Analysen zeigen, dass ca. 50 % aller Myokarditis-Patienten eine Enterovirus-Infektion hatten bzw. haben [222]. Trotzdem war die Virusätiologie der Myokarditis lange Zeit umstritten, da sich der Nachweis dieser Infektionen bei Patienten mit anamnetischer Verdachtsdiagnose klinisch zuweilen schwierig gestaltet und es vor Einführung sensitiver und spezifischer molekularbiologischer Nachweis-Techniken nur in Einzelfällen gelang, diese Ätiologie unzweifelhaft zu bestätigen. Heute besteht zum einen die Möglichkeit, infektiöses Virus aus dem Herz oder Gastrointestinaltrakt eines Patienten zu isolieren bzw. virale RNA über (RT-) PCR, Slot-Blot sowie *In situ*-Hybridisierung in myokardialen Gewebe nachzuweisen [7, 24, 168, 174]; zum anderen können virus-spezifische Antikörper serologisch detektiert werden. Aus Stuhl- und Pankreasproben vieler Myokarditis-Patienten ist es gelungen, infektiöse CVB zu isolieren und zudem erfolgreich auf Mäuse zu übertragen [369]. Da myokardiale Biopsien im klinischen Alltag eher unüblich sind, ist der Nachweis von infektiösem Virus direkt aus dem Herzen schwierig. Untersuchungen an explantiertem Herzgewebe und Autopsie-Material erbrachten jedoch positive Ergebnisse [315]. Bei ca. 43% aller Myokarditis-Patienten ist der Nachweis von CVB-RNA möglich. Im Vergleich dazu konnten bei keinem der Kontrollpatienten virale Genome detektiert werden [221]. Die Bestimmung Serotyp-spezifischer Antikörper erbringt wegen der hohen Anzahl potentiell kardiotroper Serotypen klinisch wenig Sicherheit für eine klare Diagnose. Ohne Endomyokardbiopsie mit nachfolgender histologischer, immunhistochemischer und molekularbiologisch-virologischer Auswertung ist die Diagnose einer Myokarditis klinisch praktisch nicht sicher erstellbar. Aufgrund dieser Schwierigkeiten bleiben ca. 50 % der Myokarditis-Fälle bzw. Enterovirus-Infektionen unerkannt [335]. Zudem kommt es nur bei 10 % dieser Infektionen zur Ausbildung akuter klinischer Symptome. In der Regel tritt bei der Mehrzahl (55 %) der Patienten nach einer akuten viralen Myokarditis eine Verbesserung der hämodynamischen Parameter und der Belastbarkeit ein, wobei nur bei ca. 35 % die Krankheit völlig ausheilt. Allerdings kann eine akute Entzündung in 20 % der Fälle auch in einen chronischen, stetig rezidivierenden Krankheitsverlauf übergehen oder gar tödlich enden [216].

Als eine wichtige Langzeit-Folge-Erkrankung der akuten/chronischen viralen Myokarditis wird das Krankheitsbild der DCM angesehen [250], da auch hier im Myokardgewebe in bis zu 45 % der Fälle enterovirale RNA nachgewiesen werden kann [221] und zudem eine

starke Korrelation ($P < 0,001$) zwischen einer zuvor bestehenden CV-Infektion und der sich entwickelnden DCM nachgewiesen werden konnte [268]. Es handelt sich um eine progredient verlaufende Herzinsuffizienz, bei der die fibrotischen Ventrikelwände der linken bzw. beider Herzhälften einer zunehmenden Dilatation unterliegen, in deren Folge meist systolische, aber auch diastolische Pumpfehler und eine deutliche Kardiomegalie auftreten [173]. Jedes Jahr werden in den USA ca. 10.000 neue DCM-Fälle diagnostiziert [24]. In 50 % der Fälle hat eine DCM einen letalen Ausgang und kann effektiv nur mit einer Herztransplantation therapiert werden. Die Prognose einer akuten Myokarditis/DCM scheint dabei von der An- oder Abwesenheit von CVB abzuhängen. Eine über einen Zeitraum von 15 Jahren laufende Studie zeigte, dass 25 % der Myokarditis-Patienten mit serologisch nachgewiesener CVB-Infektion an einem chronischen Verlauf oder einer DCM versterben. Dagegen traten keine Todesfälle in der serologisch negativen Gruppe auf [198]. Ausprägung und Verlauf einer bestehenden kardialen Enterovirus-Infektion werden zudem durch zum Teil unbekannte wirts- bzw. virusspezifische Faktoren bestimmt [45, 152]. So variiert beispielsweise die Inzidenz CV-induzierter Erkrankungen mit dem Alter des Betroffenen [109]: Während Neugeborene und Kleinkinder hochgradig anfällig für akute Infektionen sind, stellen junge Erwachsene ca. 52 % aller symptomatischen Myokarditisfälle dar. Chronizität einer Myokarditis oder DCM werden dagegen am häufigsten (69 %) im höheren Alter (40 Jahre und älter) erreicht. Des Weiteren sind, abgesehen von Schwangeren im dritten Trimester der Gravidität, eher Männer Myokarditis-Patienten [154, 369].

Obwohl jedoch Struktur und Genomorganisation von Enteroviren und speziell CV zum größten Teil bekannt sind, ist es bis heute nicht gelungen, eine virusspezifische präventive oder therapeutische Behandlung in der Klinik zu etablieren. Trotzdem wurden einige Ansätze entwickelt, die zum einen auf die Inhibierung der Virusreplikation mit nachfolgender Hemmung der Infektionsausbreitung und zum anderen auf die Unterstützung der Elimination infizierter Zellen durch die zelluläre Immunantwort zielen. Eine Möglichkeit besteht darin, mit Hilfe von speziellen Substanzen das virale Kapsid so stark zu stabilisieren, dass die Freisetzung der viralen RNA aus dem Viruspartikel unmöglich wird. Eine solche Substanz ist das klinisch gut erforschte Pleconaril bzw. abgewandelte Derivate. Sie blockieren die Rezeptorbindungsstellen des viralen Kapsids und verhindern so eine Adsorption an die Zelle [14, 218, 273, 283, 284]. Weiterhin konnte am murinen Modell gezeigt werden, dass eine Immunglobulin-Therapie, d. h. die Verabreichung von neutralisierenden Antikörpern, eine akute virusinduzierte Myokarditis vollständig unterdrückt [320]. Der viel versprechende Ansatz einer Therapie durch Interferon-Behandlung stützt sich auf die Bedeutung dieser Mediatoren für die unspezifische und spezifische Immunabwehr [171]. So wurde die protektive Rolle von Interferon- β (IFN- β) gegen CV sowohl *in vitro* [125] als

auch *in vivo* [225] demonstriert. Zusätzlich veröffentlichten Kühl et al. (2003) eine klinische Studie, die zeigte, dass bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion aufgrund einer enteroviralen Infektion nach IFN- β -Behandlung zum einen eine Verbesserung der Ventrikelfunktion auftrat und zum anderen keine virale RNA im Myokard mehr nachweisbar war [192]. Zudem wurde die synergetische antivirale Aktivität von IFN- β und Interferon- γ (IFN- γ) in infizierten Zellkulturen und *in vivo* nachgewiesen [126, 130]. Eine aktive oder passive Schutzimpfung als protektive Maßnahme gegen virale Myokarditis bzw. DCM konnte bis heute nicht für eine klinische Anwendung entwickelt werden, obwohl einige murine Modelle etabliert wurden [129]. Zudem ist es gelungen, stabil attenuierte Viren herzustellen, die eine protektive Immunantwort erzeugen konnten [59, 91, 291, 292, 385]. Auch der Einsatz von virusspezifischen DNA- und RNA-Vakzinen erbrachte vielversprechende protektive Ergebnisse [128, 135, 161]. Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung von spezifischen CV-Vakzinen ist die Verwendung Zytokin-exprimierender rekombinanter Viren. Dabei zeigten vor allem IFN- γ - und IL-10-exprimierende Varianten starke protektive Eigenschaften [130, 131, 136, 137].

2.3.1 Pathogenese und Immunantwort des Wirts

Ein Großteil der heute vorliegenden Erkenntnisse über die Pathogenese einer humanen CVB3-induzierten Myokarditis und DCM basiert auf experimentellen Studien am murinen Modell, da Mäuse in vielerlei Hinsicht hervorragend geeignet sind [76, 362]. Zum einen stehen für dieses Modell zahlreiche Inzucht- bzw. transgene Stämme zur Verfügung und es ist möglich, viele Tiere pro Versuchsgruppe einzusetzen, um eine statistische Auswertbarkeit zu gewährleisten. Zum anderen ist die Spezies Maus in genetischer Hinsicht äußerst gut untersucht. Weiterhin infizieren CV Mäuse mit einer dem Menschen gleichen Organpräferenz [32]. Nach einer Infektion mit CVB3 findet dabei die virale Replikation im Herz-, Pankreas- und Milzgewebe sowie im Gehirn statt und es entstehen apparente pathologische Symptome, die humanen Erkrankungen ähneln [138, 229]. Die diesen Symptomen zugrunde liegenden Pathogenese-Mechanismen werden allerdings bis heute kontrovers diskutiert. Dabei wurden im Laufe der Zeit zwei grundsätzliche Hypothesen erstellt und untersucht, die sich auf die Rolle der virusinduzierten Entzündungsantwort des Immunsystems und die Entwicklung der Herzmuskelschädigung konzentrieren. Eine erste Theorie besagt, dass die CVB-induzierte Immunantwort einen autoimmunen Charakter besitzt, wobei vier verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen könnten [95]. (i) Arbeiten von Gauntt et al. (1991/1995) und Cunningham et al. (1992) machen autoreaktive Antikörper bzw. die virale Eigenschaft, für Proteine zu codieren, die zellulären Polypeptiden ähneln und somit zu immunologischen Kreuzreaktionen führen (molekulare Mimikry),

für die Myokardschädigung verantwortlich [55, 97, 98]. So konnten z. B. autoreaktive Antikörper gegen Myosin im murinen Herzgewebe infolge einer CVB3-Infektion detektiert werden [81, 366, 367], die für den chronischen Verlauf einer Myokarditis verantwortlich sein könnten. Da diese Hypothese jedoch genaueren Untersuchungen nicht standhalten konnte [240] und schon eine Inokulation von Myosin allein (in Abwesenheit von CVB3) eine Myokarditis auszulösen vermochte, bleibt die Bedeutung autoreaktiver Antikörper für die coxsackievirale Myokarditis unklar und es wird eher angenommen, dass die Produktion dieser Antikörper als sekundäres Ereignis aus der virusinduzierten Zerstörung des murinen Herzgewebes resultiert [82, 242]. (ii/iii) Weiterhin werden aktivierte autoreaktive CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen als mögliche Ursache für die myokardialen Schädigungen verantwortlich gemacht [78]. Dabei wurde z. B. gezeigt, dass bestimmte zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) sowohl infizierte als auch nicht betroffene Zellen lysieren [157, 158]. Studien von Neu et al., die sich mit der bereits erwähnten Myosin-induzierten Myokarditis beschäftigen, favorisieren dagegen eine durch CD4⁺ T-Lymphozyten vermittelte Schädigung des Herzens [241, 243]. (iv) In neueren Untersuchungen wurde $\gamma\delta$ T-Zellen eine Bedeutung während der Pathogenese einer CVB3-induzierten Myokarditis zugesprochen [151, 153, 155]. Zusammenfassend besteht kein Zweifel, dass es im Zuge einer CVB3-Infektion zur Induktion von T-Zellen und autoreaktiven Antikörpern kommt. Ob diese virusinduzierten Immunreaktionen jedoch einen pathogenen Charakter aufweisen, bleibt umstritten. Zudem konnte in mehreren großen klinischen Studien, die z. T. über einen langen Zeitraum verliefen oder an akuter Myokarditis erkrankte Kinder berücksichtigten, kein begünstigender Effekt einer immunsuppressiven Therapie auf Verlauf und Prognose einer viralen Myokarditis nachgewiesen werden [26, 113, 139, 159, 217, 223]. Die zweite und derzeit am häufigsten vertretene Theorie zur Pathogenese einer CVB3-induzierten akuten und chronischen Myokarditis führt die myokardialen Schädigungen zum einen auf eine direkte Zelllyse durch das Virus und zum anderen auf die folgende, gegen virale Antigene gerichtete immunpathologische Reaktion des Wirtsimmunsystems (z. B. vermittelt durch CD8⁺ CTL und NK-Zellen) mit starken Zellinfiltrationen zurück [185, 227]. Der chronische Krankheitsverlauf resultiert aus der Persistenz der viralen RNA bzw. der Virusantigene, die eine fortschreitende oder rezidivierende Entzündung hervorrufen. Beide Verlaufsfomen haben demnach eine große immunpathologische Komponente [363].

Aufgrund kontrollierter *In situ*-Hybridisierungs-Studien, unter Einbezug histologischer und immunhistologischer Parameter [175], wird heute davon ausgegangen, dass eine CVB3-induzierte Myokarditis beim Menschen, analog zum Tiermodell, in zwei Phasen verläuft [76]. In der akuten Phase gelangt das Virus im Rahmen einer Virämie hämatogen zu den

verschiedenen Organen, wie Pankreas, Herz, Milz oder Leber, und repliziert dort innerhalb von 3-4 Tagen zu hohen Titern. Durch die aktive Virus-Replikation entsteht noch vor Entwicklung einer Immunantwort und inflammatorischen Infiltraten ein direkter ZPE im Myokard mit konsekutivem zellulärem Untergang [227, 288]. Dabei werden zunächst endotheliale Zellen und durch anschließende Zell-zu-Zell-Ausbreitung die Kardiomyozyten infiziert, was zu einer direkten, durch fokale Läsionen gekennzeichneten Schädigung des Herzgewebes führt [105, 141, 186]. Gleichzeitig kommt es zu einer ersten erhöhten Freisetzung von verschiedenen Zytokinen (u. a. Interleukin [IL]-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , TNF- β oder IFN- γ) durch myokardiale Zellen, wie Myozyten, Endothelzellen, Fibroblasten oder Dendritische Zellen [297]. Zudem wurden bereits in dieser Phase erste neutralisierende Antikörper detektiert, die eine bedeutende Rolle für die Kontrolle der viralen Replikation und die Beseitigung freier Virionen im Herz und anderen Geweben spielen [44, 232]. In der zweiten, subakuten Phase der Erkrankung reagiert der Wirtsorganismus mit einer aktiven Entzündungsinfiltration, infolge derer das Virus letztlich beseitigt wird und sich der Patient erholt. Im Rahmen der unspezifischen Immunantwort und stimuliert durch die Freisetzung reifer Viruspartikel ins Interstitium wandern anschließend NK-Zellen sowie Makrophagen ins Gewebe ein und eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ist detektierbar [133]. Dadurch werden antigenpräsentierende CD4⁺ und zytotoxische CD8⁺ CTL zu den multifokal verteilten Läsionen des Myokards rekrutiert, welche zusammen mit einwandernden B-Lymphozyten die unterstützende spezifische Immunantwort ausmachen [129, 156, 332, 343, 368].

Die Rolle der unspezifischen Immunantwort für die Kontrolle einer CVB3-Infektion konnte durch Studien mit immundefizienten Mäusen gezeigt werden, die nicht in der Lage waren, eine Typ-I-Interferon-vermittelte Immunreaktion auszubilden und infolgedessen schon geringen Dosen an Virus unterlagen [360]. Weiterhin weisen Knockout-Mäuse ohne NK-Zellen erhöhte virale Titer und verstärkte myokardiale Schädigungen auf [104]. Peritoneal-Makrophagen produzieren zudem in Folge einer gesteigerten IFN- γ -vermittelten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid (NO)-Synthetase (iNOS) NO, welches einen direkten antiviralen Effekt auf die CVB3-Replikation hat, da die 2A^{pro} inhibiert wird [10, 165, 381]. Eine primäre Bedeutung für die Kontrolle der Infektion hat der humorale Zweig der adaptiven Immunantwort und dabei insbesondere die Bildung neutralisierender Antikörper [44]. Dies wird durch mehrere verschiedene Untersuchungen bestätigt. Zum einen sind Patienten mit einer Agammaglobulinämie besonders anfällig für Enteroviren [234] und B-Zell-Knockout-Mäuse zeigen starke Veränderungen in Verlauf und Ausprägung einer CVB3-Infektion [232]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass therapeutisch verabreichte Immunglobuline eine Bekämpfung des Virus unterstützen [100] und maternale

Antikörper in der Lage sind, neugeborene Mäuse vor einer CVB3-Infektion zu schützen [235]. Für eine Bedeutung der zellulären T-Zell-vermittelten Immunantwort im Verlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis gab es bereits 1974 Hinweise [370], und bis heute konnte dies durch zahlreiche Studien bestätigt werden [111, 122, 183, 376], wobei die beteiligten T-Zellpopulationen abhängig vom Mausstamm variieren. CD8⁺ CTL spielen jedoch eine besondere Rolle, indem sie spezifisch virale Antigene erkennen, die durch MHC-Klasse I-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Kardiomyozyten präsentiert werden [129, 298]. Dieser Prozess wird durch die zumeist vorliegenden Zytokine IFN- γ und TNF- α noch unterstützt, da diese zum einen die Expression von MHC-I in den Myozyten steigern und zum anderen den Zell-Zell-Kontakt zwischen infizierter Zelle und T-Lymphozyt begünstigen, da sie eine erhöhte Bildung des „intracellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) stimulieren [295]. Wie unter 2.2.1 erwähnt, wird jedoch die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche durch eine CVB3-Infektion reduziert, wodurch im Vergleich zu anderen Virusinfektionen nur eine verhaltene CD8⁺ T-Zellantwort zustande kommt [52, 308]. Einer der Effektor-Mechanismen zytotoxischer T-Zellen, CVB3-infizierte Myozyten zu lysieren, ist die Freisetzung von Perforin und Granzym B, infolge derer eine Porenbildung in der zellulären Membran stattfindet und anschließend Apoptose induziert wird [21, 296]. Gebhard et al. konnten jedoch zeigen, dass dieser Perforin-Mechanismus während einer CVB3-induzierten Myokarditis eher eine Bedeutung für die immunpathologischen Schädigungen des Herzgewebes als für die Viruseliminierung hat. CVB3-infizierte Perforin-Knockout-Mäuse wiesen dementsprechend lediglich eine höhere Überlebensrate und eine milder verlaufende und schneller ausheilende Myokarditis auf. Im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigten sie dagegen keine Unterschiede in Viruslast und -verteilung und waren in der Lage, eine normale antivirale CD8⁺ T-Zellantwort auszubilden, die vermutlich durch die Produktion von IFN- γ und anderen Zytokinen unterstützt bzw. ermöglicht wird [99]. Diese und andere Untersuchungen machen deutlich, dass CD8⁺ CTL zwei bedeutende Funktionen in der Pathogenese einer CVB3-induzierten Myokarditis zukommen – eine antivirale Rolle bei der Eradikation des Virus und eine immunpathologische myokardschädigende Eigenschaft [362, 363]. Dies bestätigen auch *In vivo*-Depletionsexperimente von Henke et al. (1995), die zeigen, dass CVB3-infizierte Mäuse ohne CD8⁺ CTL deutlich höhere Virustiter im Herzgewebe aufweisen als immunkompetente Kontrollmäuse. Die Myokardschäden und Infiltrate sowie die Inzidenz für eine chronische Myokarditis waren hingegen in diesen Tieren abgeschwächt [129].

Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften der CD8⁺ CTL-Population muss für eine ideale Bekämpfung einer CVB3-Infektion die, durch diese Zellen vermittelte Immunantwort optimal ausbalanciert sein. Während eine sehr starke Reaktion immunpathologische Fol-

gen hätte, würde dagegen eine schwache oder auch künstlich supprimierte CD8⁺ T-Zellantwort eine ungenügende Viruseliminierung und demzufolge eine verstärkte Virusausbreitung mit virusinduzierter Zytolyse der Kardiomyozyten nach sich ziehen. Die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellpopulation konnte ebenfalls durch Versuche mit Knockout-Mäusen belegt werden. So konnte bei Tiere, die normalerweise relativ unanfällig für die Entwicklung einer Herzmuskelentzündung sind, nach Entfernung CD4⁺ T-Lymphozyten eine schwerwiegende Myokarditis mit reduzierten Virustitern festgestellt werden. Eine zusätzliche Depletion der CD8⁺ CTL-Population hatte dagegen eine milder verlaufende myokardiale Entzündungsreaktion mit deutlich erhöhten Titern zur Folge [129]. Diese deutet darauf hin, dass unter immunkompetenten Bedingungen eine mögliche Funktion CD4⁺ Lymphozyten die Hemmung bzw. Regulation der durch CD8⁺ CTL vermittelten Immunantwort sein könnte.

Trotz dieser starken Immunantwort entwickelt das Virus bzw. die verbleibenden RNA-Genome in Abhängigkeit von bis *dato* unbekannten genetischen Faktoren des Wirts Strategien, die eine persistierende Infektion ermöglichen und ein chronisches Krankheitsbild zur Folge haben können. So konnte mittels *In situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass in verschiedenen Mausstämmen eine Langzeit-Persistenz viraler RNA im Herzgewebe mit der Ausbildung einer chronischen Myokarditis sowie einer Fibrose assoziiert ist und dass diese virus-positiven Signale in den meisten Fällen in der Nähe inflammatorischer Herde lokalisiert sind [175, 185, 189]. Ein direkter Beweis, dass persistente virale RNA zu pathologischen Gewebeschädigungen im Myokard führt, konnte experimentell mittels transgener Mäuse erbracht werden, die nur defekte Viren im Herzmuskel exprimierten. In diesem Modell wurde nachgewiesen, dass virale RNA-Synthese allein, in Abwesenheit von infektiösem Virus, ausreicht, um eine DCM und Abnormalitäten in der Erregungsweiterleitung im Herzmuskel zu verursachen [359, 361]. Während in akut infizierten Myozyten virale Plusstrang-RNA im Vergleich zu Minussträngen im Überschuss vorhanden ist, wurden für die chronische Phase annähernd gleiche Mengen viraler Plus- und Minusstrang-RNA nachgewiesen, wobei vermutet wird, dass diese in Doppelstrang-Konformation vorliegen [322]. Zusätzlich waren alle Regionen der viralen RNA unverändert, was die frühere Vermutung entkräftet, die Enteroviruspersistenz resultiere aus distinkten genetischen Mutationen im Virusgenom. Aufgrund einer herabgesetzten Replikationsfrequenz findet außerdem eine restringierte Expression viraler Struktur- und Nichtstrukturproteine statt [185]. Zusammenfassend könnte also die Pathogenese einer chronischen Myokarditis durch drei verschiedene Mechanismen erklärt werden [362]. (i) Zum einen könnte infektiöses, persistierendes Virus sporadisch reaktiviert werden und so eine rezidivierende Entzündung hervorrufen. (ii) Zum anderen kann die Expression viraler Proteine die Kardiomyozyten

direkt schädigen [359, 361] und/oder (iii) immunpathologische Prozesse auslösen.

Eine mögliche coxsackievirale Strategie, um persistent in einem immunkompetenten Wirtsorganismus zu verbleiben, ist die Fähigkeit, eine latente Infektion in ruhenden, nicht proliferierenden Zellen zu etablieren, wobei deren Status im Zellzyklus eine entscheidende Rolle spielt. So zeigten Feuer et al. (2002), dass in Zellen, die sich in der G₀- oder G₂/M-Phase befinden, nur eine sehr stark reduzierte virale Proteinsynthese sowie eine ineffektive Viruspartikelproduktion stattfindet [85]. Werden diese Zellen jedoch zur Proliferation angeregt, steigen diese Parameter deutlich an. Diese Beobachtungen stehen zudem im Einklang mit Untersuchungen an post-mitotischen Muskelzellen, welche persistent coxsackievirale RNA enthalten [7, 94, 204, 323]. Im Herzgewebe, welches ebenfalls als post-mitotisch angesehen wird, könnte eine bestimmte teilungsaktive Myozyten-Population [25] oder Fibroblasten und Endothelzellen ein entsprechendes Target für CVB3 darstellen, was auch die fokale Infektion dieses Organs erklären würde [85, 362]. Eine weitere diskutierte Theorie über das Zustandekommen einer persistenten Infektion ist auch ein mögliches Unvermögen des Wirtsimmunsystems, das Virus während der akuten Phase vollständig zu eliminieren. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch unbekannt.

2.3.2 CVB3-Infektion in Zellen des Immunsystems

Einen weiteren pathogenetischen Aspekt im Modell der CVB3-induzierten Myokarditis und einen möglichen viralen Persistenzmechanismus stellt die Infektion von Immunzellen dar. Diese virale Strategie der Beeinflussung des Immunsystems durch eine latente oder persistente Infektion von Immunzellen wurde auch für andere Viren beschrieben, wobei der in dieser Hinsicht wohl bekannteste Vertreter das HI-Virus ist, welches u. a. CD4⁺ T-Zellen infiziert [285, 311]. Durch frühe *In vitro*-Studien konnte bereits 1985 auch für CVB3 gezeigt werden, dass es in der Lage ist, verschiedene humane lymphoide T- (z. B. MOLT-4) und B-Zelllinien (z. B. Ramos) persistent zu infizieren, wobei sich die verwendeten B-Lymphozyten als empfänglicher herausstellten. Dabei war eine Detektion infektiöser Viruspartikel auch noch mehrere Wochen bzw. Monate nach der Infektion möglich [226]. Diese Beobachtungen wurden durch Arbeiten von Vuorinen et al. (1994) bestätigt, die neben einem Nachweis viraler RNA auch eine produktive CVB3-Infektion in den humanen Lymphozyten-Linien Raji und MOLT-4 zeigten. Im Gegensatz dazu war in *In situ*-Hybridisierungsexperimenten mit *in vitro* infizierten primären peripheren mononukleären Zellen bzw. Granulozyten und Knochenmarkszellen aus gesunden Spendern nur ein geringer Prozentsatz der Zellen positiv für CVB3-Antigene. Die Neubildung viraler Proteine und infektiöser Partikel bzw. eine Virusreplikation konnte nicht festgestellt werden [347,

348]. Vertiefende Untersuchungen zeigten, dass diese divergente Anfälligkeit der verschiedenen Zelltypen nicht durch deren unterschiedlichen Reifungsgrad vermittelt wird, da auch ausdifferenzierte T- (CCRF-HSB-2) und B- (RPMI-8226) Zelllinien *in vitro* mit CVB3 infiziert werden konnten [349]. Dem gegenüber stehen Studien, in denen festgestellt wurde, dass zum einen primäre humane Monozyten-Kulturen durchaus empfänglich für CVB3 sind und es infolgedessen zur Produktion infektiöser Viruspartikel kommt [133]. Zum anderen war es möglich, Virus aus Blutzellen von Patienten mit einer nachweislichen Enterovirus-Infektion zu isolieren [263]. Untersuchungen am murinen Modell der CVB3-induzierten Myokarditis bestätigten später, dass es scheinbar auch *in vivo* zu einer Infektion von Immunzellen kommt [5, 176, 187, 189]. Mittels *In situ*-Hybridisierung konnte dabei in CVB3-infizierten immunkompetenten Mäusen neben den typischen multifokalen myokardialen Läsionen auch in den lymphatischen Organen, wie Milz und abdominalen Lymphknoten, eine hohe Anzahl virus-positiver Zellen nachgewiesen werden. Während in der akuten Phase (3-6 d p. i.) der Hauptteil der infizierten Immunzellen in der weißen Pulpa am äußeren Rande der Keimzentren lokalisiert war und nur vereinzelt positive Signale in der roten Pulpa auftraten, konzentrierte sich in der chronischen Phase der Infektion (42 d p. i.) die extrem reduzierte Menge CVB3-RNA-tragender Zellen im mittleren Teil der sekundären Follikel (ca. 200 Zellen/Follikel). Mit Hilfe einer kombinierten Nachweisttechnik aus *In situ*-Hybridisierung zur Detektion viraler Positivstrang-RNA und immunhistochemischer Markierung spezifischer Oberflächen-Antigene konnte nachfolgend gezeigt werden, dass während der akuten und chronischen Phase der Großteil der infizierten follikulären Immunzellen den für Pre-B- und B-Lymphozyten spezifischen Marker CD45R/B220⁺ aufwies. Aber auch T-Helfer- und Dendritische Zellen zu Beginn und Makrophagen in der Spätphase der Infektion enthielten coxsackievirale RNA. In B-Zellen der Marginalzone, T-Zellen der periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS) und CTL konnten dagegen keine viralen Genome nachgewiesen werden. Da zudem die Detektion viraler Negativ-RNA-Stränge durch strangspezifische RT-PCR und *In situ*-Hybridisierung möglich war, wurde nicht nur ein Beharren der Virionen, sondern auch eine virale Replikation in den murinen B-Zellen vermutet [5, 187, 189].

Die Bedeutung einer Infektion dieser Lymphozyten für den Verlauf und die Pathogenese einer CVB3-Infektion konnte dann durch vertiefende Untersuchungen von Mena et al. (1999) verdeutlicht werden. So kam es in B-Zell-Knockout-Mäusen zu einer auffällig verzögerten Streuung der Virusinfektion zu sekundären Zielorganen, wie dem Herzgewebe, was diesen Lymphozyten-Phenotyp nicht nur als einen ersten Ort der viralen Replikation bestätigt, sondern auch deren Bedeutung hinsichtlich der Virusverteilung unterstreicht [232]. Diese Theorie wird auch durch die Detektion CVB3-RNA-positiver B-Zellen im Myo-

kard infizierter Mäuse unterstützt [188]. Ein weiterer Nutzen für eine erfolgreiche Etablierung der Virusinfektion im Wirtsorganismus liegt zudem wohlmöglich in der Abschirmung vor neutralisierenden Antikörpern. Da jedoch nach wie vor vergleichsweise wenig Kenntnisse über diese coxsackievirale Strategie, B-Lymphozyten des Wirtsimmunsystems zu infizieren vorliegen, sind detaillierte Untersuchungen dieser Vorgänge für ein genaueres Verständnis der Bedeutung für Pathogenese und Verlauf einer CVB3-Infektion von großer Bedeutung.

2.4 Apoptose

Die zum ersten Mal 1972 durch Kerr et al. als programmierter Zelltod beschriebene Apoptose ist ein in allen Metazoa vorkommender Prozess, der unter anderem eine große Bedeutung für die embryonale Entwicklung [264], die Gewebshomöostase und die Regulation von Immunabwehrreaktionen hat [178]. Überflüssige sowie durch Mutationen oder Infektionen geschädigte bzw. den Organismus gefährdende Zellen werden dabei durch gerichtet ablaufende und in hohem Maße regulierte aktive intrazelluläre Reaktionsketten abgebaut und beseitigt. Dabei kommt es im Verlauf des apoptotischen Programms zu typischen, mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zelle, wie das Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern, Kondensation des Chromatins, Zerstörung von Zellorganellen, Adhäsionsverlust, Bildung von Membranausstülpungen („membrane blebbing“) und schließlich Abschnürung kleiner Vesikel von der Zelloberfläche. Diese als „apoptotic bodies“ bezeichneten membranumhüllten Strukturen werden anschließend unmittelbar von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert, wodurch eine Entzündungsreaktion des Immunsystems im umliegenden Gewebe eingeschränkt wird. Molekularbiologisch können zudem veränderte Enzymaktivitäten, Prozessierungen von Proteinen und eine starke Fragmentierung der DNA („DNA laddering“) nachgewiesen werden [245]. Auslösende Stimuli für die Induktion einer Apoptosekaskade können u. a. verschiedene Zytokine, Chemikalien, Oxidantien, ein Mangel an Wachstumsfaktoren oder eine Virusinfektion sein. Eine Fehlregulation im apoptotischen Programm führt häufig zu verschiedensten pathophysiologischen Symptomen. Dabei kann sich eine insuffiziente Apoptosefunktion als Krebs- oder Autoimmunerkrankung manifestieren und eine erhöhte Anfälligkeit für virale und persistierende Infektionen hervorrufen. Kommt es dagegen zu einer übermäßigen Apoptose, treten akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea major sowie Immundefizienz (z. B. AIDS), Herzversagen oder Infertilität auf [108, 328].

Abzugrenzen ist die Apoptose von der Nekrose [84]. Diese passive Form des Zelltodes wird durch Einflüsse wie Hitze, Strahlung, Sauerstoffmangel oder mechanische Verlet-

zungen der Zelle ausgelöst und ist durch Anschwellen der Zellen, irreversible Zerstörung der Organellen und Zellmembran, zufällige Degeneration der DNA, Vakuolen-Bildung und schließlich durch den unkontrollierten Austritt des Zellinhaltes gekennzeichnet. Aufgrund dessen entwickeln sich infolge nekrotischer Prozesse starke Entzündungsreaktionen und benachbarte Zellen werden zerstört.

Eine weitere Form des Absterbens von Zellen ist der Zelltod durch Autophagozytose, wobei der Abbau von Zellorganellen und Proteinen in großen doppelmembranhüllten Autophagolysosomen stattfindet. Dieser programmierte Tod einer Zelle wird z. B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst [377] und ist aktuellen Studien zufolge von apoptotischen und nekrotischen Prozessen abzugrenzen, da u. a. eine Beteiligung von Caspasen bislang nicht nachgewiesen werden konnte [106, 199, 329, 342].

2.4.1 Caspasen als zentrale Mediatoren der Apoptose

Eine zentrale Stellung in allen apoptotischen Signalkaskaden nehmen die Caspasen (Casp) ein. Diese Cystein-abhängigen-Aspartat-spezifischen Proteasen besitzen zwei namensgebende Eigenschaften: Zum einen verwenden sie ein Cystein im aktiven Zentrum als nukleophile Gruppe und zum anderen spalten sie im jeweiligen Substrat Peptidbindungen C-terminal von Aspartat [3]. Synthetisiert werden sie als inaktive Zymogene bzw. Procaspasen bestehend aus einer N-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer großen (p20) und einer kleinen (p10) katalytischen Untereinheit [37, 276, 330]. Ausgehend von Funktion und Struktur der regulatorischen Prodomäne können die 14 bisher in Säugtieren identifizierten Casp (Casp-11 und -12 nicht beim Menschen) in 3 Gruppen unterteilt werden. Während (i) die inflammatorischen Casp (Casp-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14) durch Spaltung innerhalb eines Inflammasoms eine Zytokinaktivierung induzieren können, sind die (ii) Initiator-Caspasen (Casp-2, -8, -9 und -10) und die (iii) Effektor-Caspasen (Casp-3, -6 und -7) für die Apoptose von Bedeutung. Die durch große Prodomänen mit DED- („death effector domain“ [Casp-8 und -10]) oder CARD- („caspase activation and recruitment domain“ [Casp-2 und -9]) Motiven gekennzeichneten Initiator-Caspasen liegen als Proenzyme zunächst in monomerer inaktiver Form vor und di- oder oligomerisieren erst nach der Induktion der Apoptose (siehe 2.4.2), wobei sie autokatalytisch aktiviert werden [22, 68, 267]. Dabei interagieren die DED- oder CARD-Motive mit homologen Domänen verschiedenster Adapterproteine, die sich zusammen zu aktiven Multiproteinkomplexen verbinden (z. B. DISC oder Apoptosom). Im Gegensatz zu dieser Aktivierung durch Di- oder Oligomerisation können die Effektor-Caspasen, welche durch kurze Prodomänen gekennzeichnet sind, nur durch eine Initiator-Caspase-vermittelte Prozessierung aktiviert werden. Anschließend findet dann die Spaltung einer Vielzahl von zellulären

Proteinen durch die aktiven Effektor-Caspasen statt, was zum eigentlichen Abbau der DNA und der gesamten Zelle führt. Eine experimentelle Untersuchung von Zellextrakten belegte jedoch, dass die Casp-3, -6 und -7 in ihrer Funktion nicht redundant sind, da der Großteil der Substratspaltungen durch die aktive Casp-3 vorgenommen wird [307]. Diese Substrate, von denen bereits mehr als 100 identifiziert wurden, können ausgehend von ihrer Funktion in der Zelle in 8 Gruppen eingeteilt werden (Tab. 1) [37].

Tab. 1: Caspase-Substrate. Ausgehend von ihrer Funktion in der Zelle können die verschiedenen Caspase-Substrate in 8 Gruppen unterteilt werden.

| | Caspase-Substrat-Gruppen | Beispiele |
|-----|---|--|
| (1) | Mediatoren und Regulatoren der Apoptose | Bcl-2, Bid, IAP, Procaspasen |
| (2) | Zytoskett- und Kernmatrixproteine | Aktin, β -Catenin, Keratin 18/19 |
| (3) | Zellzyklus-Regulatoren | Cyclin D1, p21, p27 |
| (4) | Mediatoren/Regulatoren des DNA-Metabolismus | PARP, Topoisomerase 1, DFF |
| (5) | Proteine neurodegenerativer Erkrankungen | Ataxin-3, Huntingtin |
| (6) | Mediatoren/Regulatoren des RNA-Metabolismus | eIF-2 α |
| (7) | Signalmoleküle | Akt/PKB, PKC, RasGAP |
| (8) | Transkriptionsfaktoren | NF κ -B, HSF, STAT-1 |

Eines der ersten Substrate, dessen Prozessierung im Zuge apoptotischer Prozesse beschrieben wurde, ist das DNA-Reparaturenzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), dessen Aktivität, DNA-Brüche zu erkennen und die Reparatur dieser zu veranlassen, durch eine Effektor-Caspase-3-vermittelte Spaltung unterbunden wird [196, 327]. In Kombination mit anderen DNA-degenerierenden Prozessen hat dies eine Fragmentierung der DNA und die mikroskopisch sichtbare Kondensation des Chromatins zur Folge. Die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen werden vor allem durch die Prozessierung von Zytoskelett- und Kernmatrixproteinen hervorgerufen.

Eine direkte Inhibition der Caspasen wird durch „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP), wie z. B. XIAP, c-IAP-1 und -2 vermittelt. Diese hoch konservierten und zuerst in Baculovirus identifizierten Proteine enthalten so genannte „baculovirus IAP repeats“ (BIR), welche in Kontakt mit den Caspasen treten. Am einflussreichsten unter den IAPs ist dabei XIAP, welches in der Lage ist, die Casp-3, -7 und -9 direkt zu inhibieren [34, 72, 148, 269]. Eine Inaktivierung dieser zellulären Caspase-Inhibitoren ist durch die Effektorproteine Diablo/Smac („second mitochondria-derived activator of caspases“) und Omi/HtrA2 möglich, die während der intrinsischen Apoptoseinduktion aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt werden (siehe 2.4.2 B) [167].

2.4.2 Wege der Apoptose-Induktion

Die Induktion apoptotischer Signalkaskaden und somit die Aktivierung der Initiator-Caspasen kann zum einen Rezeptor- und zum anderen mitochondrial-vermittelt ablaufen.

A: Extrinsischer, Rezeptor-vermittelter Apoptose-Weg

Auslösendes Signal bei diesem Weg des programmierten Zelltodes ist die Bindung eines homotrimeren Liganden wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), „tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL) oder Fas-Ligand an den extrazellulären Bereich eines entsprechenden transmembranalen „Todesrezeptors“. Diese Oberflächenmoleküle der TNF-Rezeptor-Familie, zu denen z. B. CD95 („Fas“), TNF-Rezeptor-1 oder TRAIL-Rezeptor1/2 zählen, weisen eine intrazelluläre „Todesdomäne“ (DD = „death domain“) auf, welche selbst keine katalytischen Eigenschaften besitzt [309, 326]. Die Interaktion mit dem Ligand führt zur Trimerisierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche, was intrazellulär eine Assoziation der DD verursacht [12]. Dies ermöglicht die Bindung von zytosolischen Adapterproteinen wie „Fas-associated death domain protein“ (FADD) oder „TNF receptor-associated death domain protein“ (TRADD), die ebenfalls DD aufweisen [163]. FADD rekrutiert anschließend die Procaspase-8 über dessen N-terminale „death effector domain“ (DED), was zur Bildung des „death-inducing signalling complex“ (DISC) führt. Infolge der Dimerisierung der Procaspase-8 im DISC und deren Umwandlung zur aktiven Casp-8 werden die DED katalytisch entfernt und die Initiator-Caspase wird ins Zytosol entlassen, wo sie durch die Spaltung anderer Caspasen und Substrate die Apoptosekaskade einleitet [1, 9, 22, 36]. Über diesen Todesrezeptor-vermittelten Weg können auch die Initiator-Caspasen-10 und -2 aktiviert werden [2, 69, 182, 352].

B: Intrinsischer, mitochondrial-vermittelter Apoptose-Weg

Entsteht ein Mangel an Wachstumsfaktoren oder treten DNA-Schädigungen (u. a.) auf, werden im Inneren der Zellen apoptotische Prozesse induziert, bei denen membranumhüllte Zellorganellen wie das ER, der Golgi Apparat (GA) oder Lysosomen jedoch in erster Linie die Mitochondrien von Bedeutung sind. Dabei findet zwischen den Organellen ein Signalaustausch statt, der letztlich eine gemeinsame Apoptosekaskade auslöst. Das zentrale Ereignis, welches durch unterschiedliche Faktoren, Proteine oder auch perforierende Chemikalien ausgelöst werden kann, ist die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, infolge derer eine Freisetzung verschiedener Proteine wie Diablo/Smac, Omi/HtrA2 oder Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum stattfindet. Während erstere IAPs inaktivieren (siehe 2.4.1), assoziiert Cytochrom C im Zytoplasma mit mehreren „apoptotic protease activating factor-1“-Molekülen (Apaf-1) zu einer radförmigen Signalplattform – dem Apoptosom [210, 387]. Apaf-1 rekrutiert durch seine „caspase activation recruitment domain“ (CARD) die Pro-Initiator-Caspase-9, wodurch es zur

Dimerisierung und Aktivierung dieser Casp kommt. Anschließend leitet die Casp-9 durch die Spaltung der Casp-3, -6 und -7 die Apoptosekaskade ein [355]. Zudem werden auch andere Proteine, wie der „apoptosis inducing factor“ (AIF) und die Endonuklease G, aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt. Diese wandern in den Kern und vermitteln gemeinsam die Fragmentierung und Degeneration der DNA [203, 313, 314].

Basierend auf der Induktion des mitochondrialen Weges werden zwei Arten von Zellen unterschieden. Bei Typ-I-Zellen ist die Aktivierung der Casp-8 im DISC ausreichend für das Auslösen der Casp-3-vermittelten Apoptosekaskade. Zellen des Typs II rekrutieren dagegen zu wenig FADD- und Casp-8-Moleküle zum DISC und sind so bei der Initiation der Apoptose auf eine Amplifikation des Signals über den intrinsischen Weg angewiesen [279]. Dazu spaltet die vorhandene Casp-8 das zytosolische Protein Bid der Bcl-2-Familie zu tBid (siehe 2.4.3). Diese prozessierte Form wird anschließend zu den Mitochondrien transportiert und löst dort die Permeabilisierung der Außenmembran und schließlich die Bildung des Apoptosoms aus [202, 215]. Somit erfolgt die Aktivierung der Casp-9, die nachfolgend die Pro-Effektor-Caspase 3 prozessiert. Die Casp-3-vermittelte Spaltung der Casp-8 schließt dann diese Amplifikationsschleife [325, 364]. Während dementsprechend in Typ-II-Zellen eine Inhibierung der Apoptose durch eine Bcl-2-Überexpression möglich ist, können Zellen des Typs I unter diesen Bedingungen weiterhin apoptotische Prozesse initiieren [60].

2.4.3 Kontrolle und Regulation der Apoptose

Die Regulation des extrinsischen Apoptosewegs kann zum einen durch so genannte „decoy“-Rezeptoren vermittelt werden, die in Konkurrenz zu den Todesrezeptoren die gleichen Liganden binden, jedoch eine Weiterleitung des Signals ins Innere der Zelle nicht ermöglichen. Zum anderen übt das Casp-8-homologe Protein cFLIP („cellular caspase-8 [FLICE]-like inhibitory protein“) eine blockierende Funktion aus. Es existiert in 2 verschiedenen Spleißformen (cFLIP_S/cFLIP_L), die beide durch eine Bindung an FADD die Rekrutierung der Casp-8 zum DISC inhibieren [341]. cFLIP_L ist zusätzlich in der Lage, mit Casp-8-Molekülen Heterodimere zu bilden, was ebenfalls eine unzureichende Aktivierung der Procaspase sowie die Rekrutierung der Adaptermoleküle RIP und TRAF2 („TNF receptor associated factor 2“) und die Aktivierung von NFκ-B zur Folge hat.

Die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirkende Mitglieder aufweist [193, 290]. Diese Proteine bilden über ihre BH-Domänen („Bcl-2 homology domain“) Homo- und Heterodimere und lösen je nach vorliegender Menge und Lokalisierung der einzelnen Vertreter unterschiedliche Apoptosewege aus. Anhand der 4 Homologiedomä-

nen (BH1-4) kann diese Proteinfamilie in 3 Subklassen unterteilt werden. (i) Die in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisierten, anti-apoptotisch wirkenden Mitglieder der ersten Gruppe wie Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 oder Boo/Diva weisen alle vier BH-Domänen auf und inhibieren die pro-apoptotischen Bax/Bak-Proteine. (ii) Diese gehören zusammen mit Bok zur zweiten Gruppe – den Multi-Domän-Proteinen und besitzen die BH-Domänen 1-3. Infolge einer apoptotischen Stimulation wandert das sonst monomere Bax zu den Mitochondrien und inseriert als Homooligomer in deren äußere Membran. Das bereits dort lokalisierte Bak oligomerisiert ebenfalls, und eine Permeabilisierung findet statt [146, 147, 357]. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings nicht vollständig aufgeklärt [380]. (iii) Die Vertreter der dritten Subklasse der Bcl-2-Familie, wie Bid, Bad, Bik, Puma oder Noxa, werden aufgrund einer einzigen vorhandenen BH3-Domäne als „BH3-only“-Proteine bezeichnet. Sie nehmen eine übergeordnete Position während der Regulation der Membranpermeabilisierung ein und können eine Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine, eine Aktivierung der pro-apoptotischen Bax/Bak Proteine oder beide Mechanismen initiieren [1]. Zudem wird ihre Aktivität sowohl auf Transkriptions- als auch auf posttranslationaler Ebene stark reguliert. Generell wird angenommen, dass je nach Typ des apoptotischen Stimulus entweder ein einzelnes oder eine bestimmte Kombination aus verschiedenen „BH3-only“-Proteinen aktiviert wird und anschließend eine indirekte oder direkte Aktivierung von Bax/Bak erfolgt [365].

2.4.4 Beeinflussung apoptotischer Prozesse durch CVB3

Wie andere Vertreter des Genus Enterovirus (z. B. Poliovirus oder Enterovirus 71) ist auch CVB3 in der Lage, durch die Manipulation verschiedener Signalwege sowie durch die Aktivität einzelner Virusproteine Apoptose zu induzieren. Im murinen Modell sind apoptotische Zellen nach einer CVB3-Infektion sowohl im Herz [99, 129, 132, 172, 277] als auch im ZNS [86] nachweisbar, und auch im Herzgewebe von Patienten mit Myokarditis oder DMC wurden apoptosebedingte Zellschädigungen beobachtet [4, 253, 294, 336]. Eine Behandlung CVB3-infizierter Mäuse mit einem Wirkstoff (WIN 54954), welcher frühe picornvirale Replikationsschritte inhibiert, hatte nicht nur eine drastische Senkung der Viruslast im Myokard, sondern auch eine Reduktion der Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten zur Folge [90, 194]. Zudem belegen zahlreiche *In vitro*-Studien eine CVB3-vermittelte Apoptoseinduktion. So zeigten Carthy et al. (1998), dass nach einer CVB3-Infektion die Pro-Caspase-3 in HeLa-Zellen aktiviert wird und nachfolgend die Spaltung spezifischer Substrate wie PARP und DFF („DNA fragmentation factor“) stattfindet. Dadurch werden DNA-Reperaturmechanismen inhibiert und die Fragmentierung der DNA initiiert. Ein Zusammenhang dieser apoptotischen Prozesse mit der Ausbildung eines ZPE konnte aller-

dings nicht festgestellt werden [30]. Weiterführende Untersuchungen bestätigten diese Beobachtungen und belegen zusätzlich die Prozessierung der Caspasen-8, -9, -6 und -7 sowie die Freisetzung von Cytochrom C. Zudem inhibierte eine Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L diese CVB3-induzierte Apoptoseprozesse. Während zusätzlich die Freisetzung reifer Viruspartikel gehemmt war, was zu erhöhten intrazellulären Viruskonzentrationen führte, hatte die Expression der beiden Proteine keinen Einfluss auf die coxsackieviralen Replikationsvorgänge [31]. Auch die Untersuchungen von Martin et al. (2007) bestätigten die Bedeutung der Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg für die CVB3-Vermehrung, da eine Behandlung CVB3-infizierter humaner 293-Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH sowohl die verzögerte Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol als auch eine Inhibierung der Virusreplikation und insbesondere der Virusfreisetzung bewirkte [219].

Weiterhin führt die CVB3-vermittelte Manipulation verschiedener zellulärer Signalwege zum programmierten Zelltod. So erfolgt nach einer CVB3-Infektion von HeLa-Zellen die Aktivierung der Stresskinase JNK („c-Jun N-terminal kinase“) und eine daraus resultierende verstärkte Expression des Cyr61-Proteins, welches die virale Vermehrung begünstigt und gleichzeitig Apoptose induziert [181]. Zudem konnte gezeigt werden, dass CVB3 in HeLa-Zellen zu Beginn der Infektion eine erhöhte Aktivität der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) durch deren Phosphorylierung über einen Tyrosin-Kinase-abhängigen Weg bewirkt [378]. Die aktive GSK3 β phosphoryliert daraufhin das zytosolische Protein β -Catenin, das dann verstärkt ubiquitinyliert und im Proteasom degeneriert wird [121]. Diese Fehlregulation der β -Catenin-Funktion, welche eine Stabilisierung des Zytoskeletts und Transkription anti-apoptotischer Gene bewirkt, trägt anschließend maßgeblich zur Ausbildung des CVB3-bedingten ZPEs und zur Apoptoseinduktion bei [378].

Auch der direkte Einfluss von CVB3-Proteinen auf die Apoptose wurde in verschiedenen Studien belegt. So induziert eine Expression der Proteasen 2A^{pro} und 3C^{pro} in HeLa-Zellen direkt den apoptotischen Zelltod über eine Casp-8-vermittelte Spaltung der Casp-3. Zum anderen bewirken beide Proteine die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die Aktivierung der Casp-9 über den intrinsischen Apoptose-Weg [39]. Während dabei die 3C^{pro} eine Steigerung der Bax-Expression und die Prozessierung von Bid bewirkt, induziert 2A^{pro} nur letztere Spaltung. Ein anderer Mechanismus für eine Induktion der Apoptose wurde von Henke et al. (2000/2001) und Martin et al. (2004) sowohl *in vitro* als *in vivo* beschrieben. Dabei kommt es nach einer Infektion mit der CVB3-Variante H3 [190] im infizierten Gewebe bzw. in infizierten 293-Zellen zu einer erhöhten Expression von zellulärem Siva. Dieses pro-apoptotische Protein interagiert dabei direkt und spezifisch mit dem viralen Kapsidprotein VP2, was anschließend zur Induktion von Apoptose

führt. Ein an Position 165 mutiertes VP2 der Virusvariante (CVB3H310A1) war dagegen weder in der Lage, mit Siva zu interagieren noch Apoptose auszulösen. Zudem wurde eine verzögerte Virusausbreitung und veränderte inflammatorische Reaktion *in vivo* beschrieben [132, 134, 220]. Wie bei Poliovirus gibt es allerdings auch Belege für eine anti-apoptotische Wirkung von viralen Proteinen. So wird die apoptose-induzierende Wirkung von Actinomycin D und Cycloheximid in CVB3-2B-exprimierenden HeLa-Zellen stark inhibiert, wobei es zu einer Hemmung der Caspasen und einer Verringerung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration im ER und GA kommt. Dies hat eine Reduktion des Signalaustausches zwischen den Zellorganellen und einen erhöhten Influx extrazellulären Kalziums zur Folge [28]. Mutanten, welche nicht in der Lage waren, die Ca^{2+} -Ionenkonzentration zu senken, zeigten dagegen keine anti-apoptotischen Eigenschaften. Später postulierten van Kuppeveld et al. (2005) einen möglichen Wirkmechanismus, wobei jeweils mehrere 2B-Moleküle Ionenporen in den Membranen von ER und GA bilden und so den Eflux von Kalzium verursachen [344].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellen und Zellkultivierung

Für die durchgeführten molekularbiologischen und virologischen Arbeiten wurden die folgende Zelllinien und primären Zellkulturen verwendet:

- **GMK-Zellen**
Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze („green monkey kidney“), adhären-tes Wachstum mit epithelialer Morphologie;
- **Raji-Zellen**
Humane B-Lymphozyten, etabliert aus einem Burkitt-Lymphom, positiv für das Wild-tyt-EBV-Genom, Suspensionszellen;
- **Murine CD19⁺ B-Lymphozyten**
Aus Milzgewebe männlicher BALB/c-Mäuse mittels MACS isolierte primäre B-Zellen, Suspensionszellen;
- **Humane CD19⁺ B-Lymphozyten**
Aus Lymphozytenkonzentraten verschiedener Blutspender mittels MACS isolierte B-Zellen, Suspensionszellen.

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt sowie einer Luftfeuchte von 95 % in den entsprechenden Kulturmedien. Da die aufgeführten primären Zellkulturen nicht zu Teilungsprozessen in der Lage sind, erfolgte eine Passage nur bei den immortalisierten Zelllinien. Dabei wurden die adhären-t wachsenden Zellen mittels Trypsin von der Gefäßoberfläche abgelöst, in frischem Kulturmedium resuspen-di-ert und ein Teil verworfen bzw. je nach Bedarf neu ausgesät. Suspensionszellen wurden durch das Dekandieren eines Teils der Kultur und Zugabe neuen Mediums passagiert. Um eine Lagerung einer Zellkultur über einen längeren Zeitraum und eine anschließend gute Vitalität der Zellen bei der Weiterkultivierung zu erreichen, war es nötig, eine Kryokul-tur der Zelllinien anzulegen. Dafür wurde den resuspendierten Zellen 10 % DMSO zuge-setzt, um sie zunächst bei -80 °C und später für ei-ne längerfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff (-170 °C) aufbewahren zu können. Für ei-ne spätere Weiterkultivierung erfolgte zunächst ein zügiges Auftauen der Kryokultur bei 37 °C und ein Zentrifugieren für 10 min bei 1000 U/min. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und, zur weiteren Kultivierung im Brutschrank, ausgesät.

- **Medium für GMK-Zellen:** DMEM-Medium [„Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ (Lonza) inklusive 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin] mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (PAA, inaktiviert bei 56 °C für 30 min); 1 % NaHCO₃; 5 ml L-Glutamin [Lonza (200 mM in 0,85 % NaCl)]; 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin [Lonza PEN-STREP (10000 U/ml Penicillin, 10000 U/ml Streptomycin)]
- **Medium für Raji-Zellen:** RPMI 1640-Medium [„Roswell Park Memorial Institute“ (Lonza) inklusive L-Glutamin] mit Zusatz von 12 % fetalem Kälberserum; 5 ml L-Glutamin [Lonza (200 mM in 0,85 % NaCl)]; 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin
- **Medium für primäre B-Lymphozyten:** RPMI 1640-Medium [„Roswell Park Memorial Institute“ (Cambrex) inklusive 25 mM HEPES, L-Glutamin] mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum; 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin
- **PBS:** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4
- **Trypsinlösung:** PBS mit 0,4 % Trypsin (Biochrom, zur Zellzucht geeignet), 0,1 % Chelaplex III und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin

3.1.2 Präparation von Einzelzellsuspensionen aus murinem Milzgewebe

Nach aseptischer Entnahme des Organs wurden die Milzen bzw. Milzstücke der Tiere einer Versuchsgruppe gepoolt und sofort in FKS-haltigem RPMI-Medium auf Eis gelagert. Mittels eines Glas-Homogenisators erfolgte anschließend durch dreimaliges Auf- und Abbewegen des Kolbens die mechanische Auflösung der Gewebestruktur, wobei die herausgelösten Lymphozyten intakt blieben. Nach Zentrifugation der entstandenen Einzelzellsuspension (5 min, 3600 U/min, 4 °C) und Verwerfen des überstehenden Mediums bewirkte die Zugabe von 0,83 %igem Ammoniumchlorid (1 ml/Milz, RT) eine Lyse der Erythrozyten. Um ein unerwünschtes Platzen der isolierten Lymphozyten zu unterbinden, wurde der Prozess nach 2,5 min durch die Zugabe von frischem FKS-haltigem RPMI-Medium gestoppt und das Zellpellet vom Überstand durch erneutes Zentrifugieren (5 min, 3600 U/min, 4 °C) getrennt. Anschließend wurden die Zellen in einer der Zellzahl angepassten Menge an kaltem MACS-Puffer resuspendiert (siehe 3.1.4.1) und über einen Pre-Separations-Filter gegeben, der sowohl Zellklumpen als auch Reste des Milzgewebes entfernte, so dass eine reine Einzelzellsuspension aus Milzlymphozyten zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung stand.

- **MACS-Puffer:** 2 mM EDTA und 0,5 % BSA in PBS, steril filtriert
- **Ammoniumchlorid-Lösung.:** 0,83 % NH₄Cl, steril filtriert
- **Pre-Separations-Filter:** Maschendurchmesser: 30 µm (Miltenyi Biotec)

3.1.3 Isolation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die verwendeten Lymphozytenkonzentrate („Buffy Coats“) entstammten jeweils verschiedenen, gesunden Spendern und wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums der FSU Jena zur Verfügung gestellt, wo sie einen Tag vor Verwendung aus heparinisierten Vollblutkonserven durch Entfernung des Plasmas hergestellt wurden. Um aus der viskösen Zellmasse eine liquide Zellsuspension herzustellen, wurde diese zunächst im Verhältnis 3:1 mit PBS verdünnt. Zur Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC = „peripheral blood mononuclear cells“), welche B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen und Thrombozyten umfassen, erfolgte anschließend eine Dichtegradienten-Zentrifugation. In 50 ml Schraubdeckelröhrchen wurden dafür 30 ml des verdünnten Bluts vorsichtig über 15 ml eines Sucrose-Polymers (Ficoll) geschichtet, so dass sich die zwei Lagen nicht vermischten. Durch die speziell eingestellte Dichte der Ficoll-Substanz und die unterschiedlichen Dichten der einzelnen Zellarten konnten während der folgenden isopyknischen Zentrifugation (30 min, 2000 U/min, RT, ohne Bremse) Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren und Granulozyten in diese Schicht eindringen, wohingegen sich die mononukleären Zellen zwischen Ficoll und Rest-Serum ansammelten (Abb. 4). Diese so genannte Interphase wurde anschließend vorsichtig abpipettiert und die enthaltenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen (jeweils 20 min, 2800 U/min, 4 °C, mit Bremse). Das entstandene Zellpellet wurde dann in einer der Zellzahl angepassten Menge an kaltem MACS-Puffer resuspendiert (siehe 3.1.4.1) und über einen Pre-Separations-Filter gegeben.

- **Ficoll/Biocoll Separating Solution:** Dichte: 1,077 g/ml (Biochrom)
- **Pre-Separations-Filter:** Maschendurchmesser: 30 µm (Miltenyi Biotec)

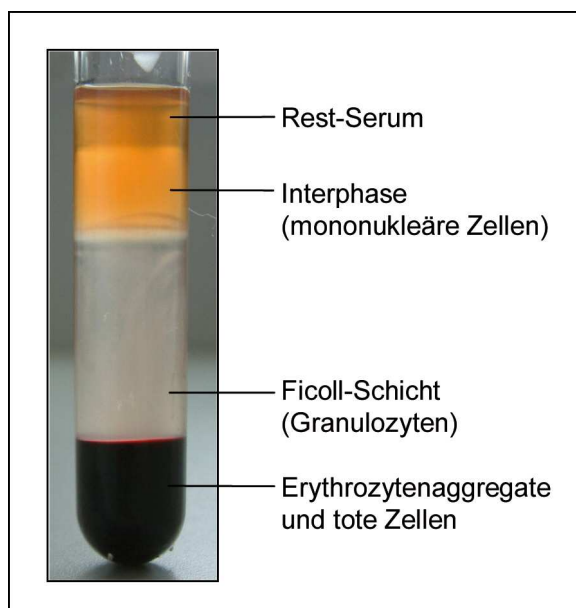


Abb. 4: Auftrennung eines humanen Lymphozytenkonzentrates mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Ein mit PBS verdünntes Vollblutkonzentrat wurde auf eine Ficoll-Säule geschichtet und anschließend durch isopyknische Zentrifugation in die verschiedenen Zellbestandteile aufgetrennt. Dabei gelangten die mononukleären Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) in die Grenzschicht (Interphase) zwischen Rest-Serum und Ficoll, während Erythrozyten, Zelltrümmer und Granulozyten die Ficoll-Schicht durchdrangen oder darin festgehalten wurden.

3.1.4 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Um aus frisch präparierten murinen Milzzellsuspensionen bzw. humanen PBMCs, CD19⁺ B-Lymphozyten zu isolieren, wurde ein magnetisches Zellsortierungssystem verwendet (MACS = „**M**agnetic-**A**ctivated **C**ell **S**orting“; Miltenyi Biotec GmbH). Dieses Separationssystem bedient sich submikroskopisch kleiner (Durchmesser: ca. 50 nm), superparamagnetischer Partikel (MACS-MicroBeads), die an hochspezifische, monoklonale Antikörper gegen ein spezielles Zelloberflächenantigen, im vorliegenden Falle gegen den B-Zell-spezifischen Marker CD19, gekoppelt sind. Dabei haben diese MicroBeads keinen Einfluss auf Struktur-, Funktions- oder Aktivitätszustand der markierten Zellen. Bei der Passage durch eine mit ferromagnetischen Kügelchen bestückte Säule, die in ein permanent starkes Magnetfeld eingebracht wird, werden markierte Zellen zurückgehalten, während Zellen, die das spezielle Antigen nicht exprimieren, die Säule ungehindert durchlaufen können (Positivselektion).

3.1.4.1 Magnetische Markierung

Im ersten Schritt wurde das zu trennende Zellgemisch auf eine Zellzahl von 10^7 Zellen pro 90 µl MACS-Puffer eingestellt, mit 10 µl pro 10^7 Zellen eines MicroBead-gekoppelten Anti-CD19-Antikörper (der jeweiligen Spezies entsprechend) versetzt und anschließend für 15 min bei 8 °C im Dunkeln inkubiert. War eine Überprüfung der Sensitivität der Methode nötig, wurde dem Gemisch nachfolgend ein Fluoreszeinisothiocyanat- (FITC-) markierter Antikörper zugegeben (für 10 min bei 8 °C), der ebenfalls alle CD19⁺ Zellen markierte. Die Auswertung erfolgte nach der Separation CD19⁺ Zellen fluoreszenzmikroskopisch. Durch Zugabe von MACS-Puffer (1 ml Puffer pro 10^7 Zellen) und anschließender Zentrifugation (15 min, 1000 U/min, 4 °C) wurde die Zellsuspension dann von überschüssigen Antikörpern befreit. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl pro 10^8 Zellen resuspendiert.

3.1.4.2 Magnetische Sortierung

Entsprechend der zur Verfügung stehenden Gesamtzellzahl wurden verschiedene Separationssäulen unterschiedlicher Fassungskapazitäten ausgewählt (MS-Säulen: $\leq 2 \times 10^8$ Zellen; LS-Säulen: $\leq 2 \times 10^9$ Zellen), ins Magnetfeld eines VarioMACS-Separators eingesetzt und zunächst mit kaltem MACS-Puffer equilibriert (MS-Säulen: 500 µl; LS-Säulen: 3 ml). Anschließend erfolgte dann die Zugabe der magnetisch markierten Zellsuspension. Während der folgenden Passage der Flüssigkeit hafteten markierte Zellen am Säulenmaterial, wohingegen CD19⁻ Zellen als negative Fraktion im Durchfluss aufgefangen wurden. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit kaltem MACS-Puffer (MS-Säulen: je 500 µl; LS-Säulen: je 1 ml) wurde diese aus dem Magnetfeld entfernt und die selektierten CD19⁺

B-Lymphozyten durch Zugabe von frischem MACS-Puffer mittels eines Druckstempels eluiert (MS-Säulen: 1 ml; LS-Säulen: 5 ml). Die isolierten Zellen fanden entweder umgehend in experimentellen Versuchsabläufen Verwendung oder wurden über Nacht in FKS-haltigem Kulturmedium bei 4 °C gelagert.

- **anti-CD19 MicroBeads (human/mouse)** (Miltenyi Biotec)
- **Ratte-anti-Maus CD19-FITC:** 1 µg/10⁶ Zellen (Serotec)
- **Maus-anti-Humanes CD19-FITC:** 1 µg/10⁶ Zellen (EuroBioScience)
- **MS-/LS-Separationssäulen** (Miltenyi Biotec)
- **VarioMACS-Seperator** (Miltenyi Biotec)

3.1.5 Durchflusszytometrie

Um die Anzahl infizierter muriner CD19⁺ B-Zellen in Folge einer CVB3H3/EGFP-Infektion zu bestimmen, wurden diese 3 d p. i. unter Verwendung eines BD FACSAria mittels Durchflusszytometrie am Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut eV in Jena unter Anleitung von Prof. Dr. Falk Weih analysiert. Dabei erfolgte eine Detektion des viral gebildeten EGFP bei einer Wellenlänge von 488 nm. Nicht infizierte B-Zellen dienten dabei als Negativkontrolle. CVB3H3/EGFP-infizierte Raji-Zellen (Inkubationszeit: 24 h) wurden als EGFP-Fluoreszenz-Referenz herangezogen. Vor dieser Analyse erfolgte zusätzlich eine Inaktivierung der infektiösen Viruspartikel durch eine Formalinbehandlung, wobei die Zellen zunächst pelletiert und dreimal mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Lymphozyten in Formalinlösung resuspendiert. Nach einer 60-minütigen Bestrahlung mit UV erfolgte ein weiterer Waschschriff mit PBS und die Aufnahme der Zellen in ausreichend FACS-Puffer.

- **Formalinlösung:** 3 % in PBS
- **FACS (“fluorescence activated cell sorting”)-Puffer:** 2 % FKS in PBS

3.1.6 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

Um den Vitalitätszustand der durch MACS-Technologie isolierten CD19⁺ B-Lymphozyten zu untersuchen, wurden die Zellen mit Trypanblau behandelt. Dieser saure Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran toter Zellen ins Zytosol und bindet dort als Anion an Proteine. Dadurch werden diese Zellen blau gefärbt, während lebende Zellen hell erscheinen. Die Lymphozytensuspensionen wurden im Verhältnis 2:1 mit Trypanblaulösung versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine lichtmikroskopische Analyse der Zellen.

- **Trypanblaulösung:** 0,5 % Trypanblau in NaCl (0,9%-ig)
- **Lichtmikroskop:** Carl Zeiss Jena: „TELAVAL3“

3.1.7 Anti-CVB3-Seren

Für die Untersuchungen zur Antikörper-vermittelten Aufnahme von CVB3 in CD19⁺ B-Lymphozyten wurden verschiedene aus Vollblut gewonnene (Zentrifugation: 15 min 3000 U/min) Seren verwendet (Tab. 2), welche CVB3-spezifische Antikörper enthielten. Die Bestimmung des jeweiligen Antikörpertiters erfolgte mittels Neutralisationstest (siehe 3.2.5). Seren ohne virusspezifische Antikörper dienten als Kontrollen.

Tab. 2: Herkunft der für die Vorinkubation von CVB3H3 verwendeten Anti-Seren.

| Anti-CVB3-Serum | Herkunft |
|-----------------|---|
| murin | Isolation aus Blut CVB3M2-infizierter C57BL/6-Mäuse (7 d p. i.) |
| human | Isolation aus Blut eines männlichen seropositiven Spenders |

3.1.8 Infektionsexperimente *in vitro*

3.1.8.1 Vorinkubation von CVB3 mit CVB3-spezifischem Anti-Serum

Je nach Versuchsansatz wurden 1×10^6 murine oder 5×10^5 humane CD19⁺ B-Lymphozyten bzw. Raji-Zellen mit vorbehandeltem CVB3H3 infiziert. Dafür wurde ein Volumen an Virussuspension, welches der 10-fachen Zellzahl/pro well, d. h. einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10 entsprach, vor der Infektion im Verhältnis 1:1 mit einem verdünnten murinen (1:100) bzw. humanen (1:200) Anti-CVB3-Serum (siehe 3.1.7) versetzt und für 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Als Negativkontrolle dienten Virussuspensionen, die mit Seren ohne virusspezifische Antikörper behandelt worden waren. Anschließend wurde dieses Virus-Serum-Gemisch zu den B-Zellen gegeben. Sowohl das Einstellen der Zellsuspensionen auf die gewünschte Zellzahl als auch die Verdünnung der Anti-Seren erfolgte dabei mit FKS-freiem RPMI (+HEPES). Die infizierten Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und zu den angegebenen Zeiten p. i. durch Zentrifugation pelletiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 150 µl Kulturmedium resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der auf diese Weise separierten intrazellulären Virusmenge pro Probe erfolgte mittels TCID₅₀-Test. Um eine Aufnahme der an Antikörpergekoppelte Viruspartikel auch auf Translationsebene zu untersuchen, wurden murine CD19⁺ B-Zellen mit CVB3H3/EGFP infiziert, welches wie oben beschrieben mit Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum vorbehandelt wurde. Nach einer Inkubationszeit (IKZ) von 20-24 h und einem Waschschrift mit PBS erfolgte eine Proteinisolierung aus diesen Kulturen und anschließend eine EGFP-spezifische Western Blot-Analyse (siehe 3.4.14).

3.1.8.2 Vorinkubation von CVB3 mit behandeltem Anti-Serum

Die Infektion der murinen CD19⁺ B-Zellen mit CVB3H3 sowie die Vorinkubation der Virussuspension mit Anti-CVB3-Serum erfolgten bei diesen Versuchsansätzen wie unter 3.1.8.1 beschrieben. Zusätzlich wurde jedoch das verwendete Anti- bzw. Kontroll-Serum vor Zugabe zur Virussuspension, wie jeweils angegeben, mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt oder verdünnt. Auch hier erfolgte sowohl das Einstellen der Zellsuspensionen auf die gewünschte Zellzahl als auch die Verdünnung der Anti-Seren mit FKS-freiem RPMI (+HEPES). Die infizierten Zellen wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und 2 h nach der Infektion pelletiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 150 µl Kulturmedium resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der auf diese Weise separierten intrazellulären Virusmenge pro Probe erfolgte mittels TCID₅₀-Test.

- **Protein A:** Stammlösung 1 mg/ml (steril filtriert), Endkonzentration 200 µg/ml (Sigma), IKZ: 30 min RT
- **EGTA (Ethylenglycoltetraacetat):** Stammlösung 0,5 M (steril filtriert), Endkonzentration 10 mM, IKZ: 30 min RT
- **EDTA (Ethylendiamintetraacetat):** Stammlösung 0,5 M (steril filtriert), Endkonzentration 10 mM, IKZ: 30 min RT
- **MgCl₂ (Magnesiumchlorid):** Stammlösung 1 M (steril filtriert), Endkonzentration 7 mM, in Kombination mit EGTA eingesetzt IKZ: 30 min RT

3.1.8.3 Blockierung zellulärer Fcγ-Rezeptoren

Um die Bindung der Fc-Teile von Antikörpern an die Fcγ-Rezeptoren auf der Oberfläche muriner CD19⁺ B-Lymphozyten zu unterbinden, wurden diese entweder mit einem FITC-gekoppelten anti-CD32/CD16-Antikörpern in den angegebenen Konzentrationen pro 10⁶ Zellen (IKZ: 90 min bei 37 °C) oder mit einem kommerziell erhältlichen Fc-Blockierungsreagenz (IKZ: 10 min bei 4 °C) versetzt und inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift mit PBS erfolgte dann die Infektion der Zellen mit Anti- bzw. Kontroll-Serumvorinkubiertem CVB3H3 (m.o.i. 10) wie unter 3.1.8.1 beschrieben. Weiterhin wurde die Bindung FITC-markierter anti-CD32/CD16-Antikörper an die Oberfläche muriner CD19⁺ B-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die infizierten Zellen wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und 2 h nach der Infektion pelletiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 150 µl Kulturmedium resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der intrazellulären Virusmenge pro Probe erfolgte mittels TCID₅₀-Test. Auch die mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-CD32/CD16-Antikörper behandelten CD19⁺ B-Zellen wurden mit vorbehandeltem CVB3H3/EGFP infi-

ziert und für 3 d inkubiert. Anschließend erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS eine Proteinisolierung aus diesen Kulturen und eine anschließende EGFP-spezifische Western Blot-Analyse (siehe 3.4.14).

- **Ratte-anti-Maus CD32/CD16-FITC:** Klon 93, Endkonzentration 0,5-5 µg/10⁶ Zellen (eBioscience USA bzw. NatuTec Deutschland)
- **FcR Blocking Reagent (mouse)** (Miltenyi Biotec)

3.1.8.4 In vitro-Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren

Für die Blockierung der zellulären Caspasen wurden 1 x 10⁶/100 µl murine oder 5 x 10⁵/100 µl humane CD19⁺ B-Lymphozyten bzw. Raji-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. jeweils angegeben) infiziert und zeitgleich mit einem von zwei irreversiblen zellpermeablen Pan-Caspase-Inhibitoren (je 200 µM) – Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH – behandelt. Kontrollkulturen erhielten gleiche Volumina an DMSO. Nach einer Inkubation der Zellen bei 37 °C erfolgte zu den angegebenen Zeiten p. i. die Probennahme, wobei für eine Bestimmung der intra- und extrazellulären Virustiter die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt wurden. Nach dem Waschen der Pellets mit PBS wurden diese in je 100 µl Medium aufgenommen. Beide virushaltigen Suspensionen wurden bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte anschließend mittels TCID₅₀-Test.

Um die Wirkung dieser Caspase-Inhibitoren auf die virale Translation zu überprüfen, wurden die verschiedenen Zellen mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) infiziert und gleichzeitig mit einer der beiden Substanzen behandelt. Während die Expression von EGFP in infizierten humanen Raji-Zellen (+ je 200 µM Inhibitor) mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden konnte (siehe 3.1.10), wurde aus infizierten CD19⁺ B-Lymphozyten, die über einen Zeitraum von 3 d aller 12 h mit je 50 µM Inhibitor behandelt worden waren, Protein isoliert und die entstandenen Mengen an EGFP mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe 3.4.14).

- **Z-VAD-FMK (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-(O-methylated)-fluoromethylketon):** Stammlösung 80 mM gelöst in DMSO, Endkonzentration 200 µM bzw. 50 µM (R&D Systems bzw. MP Biomedicals)
- **Q-VD-OPH (Quinoline-Valin-Aspartat-(non-O-methylated)-CH₂-difluorophenoxy-methylketon):** Stammlösung 80 mM gelöst in DMSO, Endkonzentration 200 µM bzw. 50 µM (MP Biomedicals)

3.1.9 LPS-Stimulation CD19⁺ B-Zellen und WST-1-Proliferations-Assay

Um die mittels MACS-Technologie isolierten murinen und humanen CD19⁺ B-Zellen zur Proliferation anzuregen bzw. zu aktivieren, wurde den Kulturen (48-well-Zellkulturplatten, 1×10^6 Zellen/400 μ l) bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) in einer Konzentration von 5 μ g/ml zugesetzt. Kontrollkulturen blieben unbehandelt.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Stimulation wurden parallel CD19⁺ B-Zellen in 96-well Zellkulturplatten (1×10^6 Zellen/200 μ l) kultiviert und in gleicher Weise behandelt. Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen colorimetrischen Testsystems, dessen Prinzip auf der Umsetzung des farblosen Tetrazolium-Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in ein farbiges Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen beruht. Dabei korreliert die Menge an entstandenem Formazan direkt mit der Anzahl vitaler Zellen bzw. mit der Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellkultur.

Zu den angegebenen Zeiten nach LPS-Zugabe wurde jede Kultur (in Triplikaten) mit 20 μ l (1/10) WST-1-Reagenz versetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Da in Abhängigkeit vom Kulturmedium eine spontane Umsetzung von WST-1 auftreten kann, wurde drei zusätzlichen, mit 200 μ l RPMI (+ HEPES/+ FKS) befüllten Wells, die gleiche Menge an WST-1-Reagenz zugesetzt. Im Abstand von einer Stunde bis zu 4 h-12 h nach WST-1-Zugabe wurde die Intensität der Färbung in den einzelnen Testkulturen durch eine Messung der Absorption bei 450 nm mit Hilfe eines Plattenphotometers („Mikroplate Reader Dynatech MR5000“) bestimmt. Die gemessenen OD-Werte (Hintergrundabsorption) Medium-befüllter Wells wurden jeweils gemittelt und später von den für die in LPS- und Kontrollkulturen gemessenen Absorptionen abgezogen.

- **LPS:** aus *E. coli* Serotyp 0111:B4, Stammlösung: 1 mg/ml, steril filtriert (Fluka)
- **Cell Proliferation Reagent WST-1** (Roche)

Die Infektion stimulierter und unbehandelter CD19⁺ B-Lymphozyten mit CVB3H3 (m.o.i. 10) erfolgte 24 h nach der Zugabe von LPS. Unmittelbar nach der Infektion (= 0 h p. i.) sowie zu den angegebenen Zeiten p. i. wurden die Zellen (3 unabhängigen Kulturen pro Gruppe) durch Zentrifugation (short spin) vom Überstand getrennt, das Pellet mit PBS gewaschen und in 150 μ l frischem Medium bei -80 °C eingefroren. Die Bestimmung der auf diese Weise separierten intrazellulären Virusmenge pro Probe erfolgte mittels TCID₅₀-Test.

3.1.10 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Die Detektion von viral gebildetem EGFP in CVB3-infizierten Raji-Zellen sowie von Antikörper-gekoppeltem FITC erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie, wobei die Zellen zu den angegebenen Zeiten p. i. durch Zentrifugation zunächst pelletiert und anschließend in einem geringen Volumen Kulturmedium aufgenommen wurden. Nach dem Überführen dieser Suspension auf Objektträger und Aufsetzen eines Deckgläschens erfolgte eine Analyse mit dem „Axioskop 2 MOT“ (Zeiss) und die Aufnahme von fluoreszenzmikroskopischen Bildern mit Hilfe einer „AxioCam color“ in Verbindung mit der „AxioVision 3.1“-Software.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Virusstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden Coxsackieviren B3 vom Stamm „Nancy“ verwendet, die nach Transfektion von GMK-Zellen mit entsprechender Plasmid-kodierter cDNA isoliert werden konnten:

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| CVB3H3 | (Variante Woodruff [190]) |
| CVB3H3/EGFP | (Variante Woodruff/Kandolf [85, 308]) |
| CVB3M2 | ([206]) |

3.2.2 Virusvermehrung

Für die Vermehrung der Viren wurde der vollständig geschlossene und etwa 2-3 Tage alte GMK-Zellrasen einer 175 cm² Kulturflasche mit Virus, verdünnt in einem geringen Mediumvolumen, infiziert. Um eine hohe Adhäsionsrate der Virionen zu ermöglichen, erfolgte dazu eine 45-minütige Inkubation bei 37 °C, wobei ein regelmäßiges Schwenken der Kultur ein Austrocknen des Zellrasens verhinderte. Anschließend wurde frisches Medium zugegeben und die Kultur so lange im Brutschrank kultiviert bis diese einen deutlichen ZPE aufwies. Die Ernte der Viren aus den Zellen erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-80 °C) und Auftauen der Kulturflasche. Nach Zentrifugation (10 min, 5000 U/min) wurde der klare, virushaltige Überstand portioniert und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.3 Viruskonzentrationsbestimmung

3.2.3.1 Plaque-Test

Um die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro Volumeneinheit einer Probe zu bestimmen, wurde ein definiertes Volumen (333 µl) unterschiedlicher Verdünnungsstufen (logarithmische Verdünnungsreihe; Basis 10) dieser Suspension auf konfluente GMK-Zellkulturen

(6-well Zellkulturplatten) aufgetragen und im Brutschrank unter regelmäßigem Schwenken inkubiert, um eine Adhäsion aller vorhandenen Viruspartikel zu ermöglichen. Nach 45 min wurde die Viruslösung entfernt und es erfolgte ein Übersichten der Zellkulturen mit einer Agar-enthaltenden Mediumschicht („overlay“), die ein vertikales Ausbreiten der Viren verhinderte. In den folgenden 3 Inkubationstagen bei 37 °C/5 % CO₂ bildeten sich gut voneinander trennbare virusbedingte Lysehöfe (Plaques), die durch ein Färben mit Kristallviolet-Formaldehyd sichtbar gemacht wurden. Da dieser Farbstoff die noch adhären-ten Zellen violett färbt, waren die entstandenen Plaques nach Herausspülen der Farblösung und der „overlays“ als helle, durchsichtige Bereiche zählbar, wobei die Menge der Plaques der Zahl infektiöser Einheiten („plaque forming units“ = pfu) entsprach. So ergab sich die Viruskonzentration der Suspension als pfu/ml aus Anzahl der Plaques pro well bezogen auf das eingesetzte Volumen und die jeweilige Verdünnungsstufe.

- **[pfu/ml]** = Anzahl der Plaques/well x Verdünnungsstufe x 3
- **„overlay“ für Plaque-Test:** doppelt konzentriertes MEM („Minimal Essential Medium Eagle“, Sigma # M0643; 47,95 g gelöst in 2,5 l destilliertem Wasser; steril filtriert) versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin sowie mit 0,5 % Agar („Purified Agar“, DIFCO LABORATORIES; Stammlösung: 1 % in sterilem, destilliertem Wasser), temperiert auf 42 °C
- **Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung für Plaque-Test:** 0,2 % Kristallviolett; 3,5 % Formaldehyd; 20 % Ethanol

3.2.3.2 Endpunktmethode – Tissue culture infectious dose 50 % (TCID₅₀)-Test

Der TCID₅₀-Test beruht auf dem Prinzip einer quantitativen Endpunkttitration nach Reed und Muench (1938) [266]. Hierfür wurden die Wells einer 96-well Zellkulturplatte mit je 100 µl einer GMK-Zellsuspension (2 x 10⁵ Zellen/ml) befüllt und für ca. 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden separate Verdünnungsstufen (logarithmische Verdünnungsreihe; Basis 10) der zu untersuchenden Virussuspension angefertigt, die dann in 4 Parallelen zu je 50 µl/well aufgetragen wurden. Nach einer vier- bis fünftägigen Inkubation bei 37 °C/5 % CO₂ erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung jedes Wells auf das Vorhandensein eines virusspezifischen ZPEs. Der Virustiter (TCID₅₀/50 µl) wurde dann als das Reziproke des Endpunktes der Suspensionsverdünnung berechnet, d. h. ausgehend von der Verdünnung, bei der 50 % aller Testeinheiten noch mindestens eine infektiöse Einheit pro eingesetztem Volumen aufwiesen und somit ein ZPE erkennbar war.

3.2.4 Infectious Center Assay (ICA)

Um die Menge an CD19⁺ B-Zellen zu bestimmen, die mit CVB3H3 infiziert waren, wurde zunächst die Zellzahl der mittels MACS selektierten Lymphozyten infizierter oder nicht infizierter Mäuse bestimmt. Anschließend erfolgte die Herstellung einer logarithmischen Verdünnungsreihe (1:10) dieser Zellen, aus deren Stufen dann jeweils 100 µl auf konfluente GMK-Zellkulturen (6-well Zellkulturplatten) überführt wurden. Durch das Auftragen einer 0,5 % Agar-enthaltenden Mediumschicht („overlay“) und die damit einhergehende Immobilisierung der Lymphozyten war eine ausschließlich horizontale Ausbreitung der vorhandenen Viruspartikel gewährleistet. Nach Inkubation der Kulturen bei 37 °C/5 % CO₂ für drei Tage wurden die adhärenenten, lebenden GMK-Zellen mittels Kristallviolett-Formaldehyd angefärbt, während die virusbedingt entstandenen Lysehöfe (Plaques) nach Herausspülen der Farblösung und des „overlays“ als helle, durchsichtige Bereiche sichtbar blieben und ein Auszählen möglich war. Dabei entsprach jeder Plaque einer virusinfizierten B-Zelle.

Um die Sensitivität dieses Tests zu ermitteln wurden entsprechend den Angaben von Mena et al. Positivkontroll-Experimente durchgeführt [232]. Dafür erfolgte eine Inkubation von GMK-Zellen mit einer definierten Menge an pfu des Virusstamms CVB3H3 (m.o.i. 10) für 45 min. Nach dreimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen abgelöst, verdünnt und wie oben beschrieben auf einen konfluenten GMK-Zellrasen aufgetragen. Drei Tage später wurden die Kulturen mit Kristallviolett-Formaldehyd gefärbt und es erfolgte ein Auszählen der Plaques.

- **„overlay“ und Kristallviolett-Formaldehyd-Lösung für ICA:** siehe Plaque-Test 3.2.3.1

3.2.5 Neutralisationstest

Die Quantifizierung neutralisierender Antikörper muriner oder humaner Blutproben erfolgte nach einer Methode, bei der durch Titration diejenige Serum-Verdünnung bestimmt wurde, die durch die enthaltenen Antikörper eine konstante Virusmenge noch vollständig neutralisierte. Dazu wurde zunächst der Serumanteil des Blutes von den zellulären Bestandteilen durch Zentrifugation (30 min, 3000 U/min) getrennt. Anschließend wurde in einer 96-well Zellkulturplatte eine Verdünnungsreihe beginnend mit 1:10 (1:20, 1:40, 1:80, 1:160 usw.) der zu untersuchenden Serumprobe angefertigt, wobei jede Verdünnungsstufe 4 Parallelen à 25 µl Endvolumen/well umfasste. Zu allen wells wurden dann je 25 µl einer eingestellten CVB3H3-Suspension gegeben. Dafür erfolgte zuvor das Einstellen einer Virus-Stammsuspension mit bekannter Partikelmenge auf zwei unterschiedliche

Konzentrationen, wobei der Wert zum einen etwas über und zum anderen etwas unter einer Virusmenge von 100 TCID₅₀ lag. Jede dieser Virusverdünnungen wurde dann zu je zwei der vier wells einer Serumverdünnungsstufe pipettiert. Um die tatsächliche Viruskonzentration festzustellen, wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe (10⁻¹ bis 10⁻⁹ à 4 Parallelen) der Virus-Stammsuspension angefertigt und jeweils zu vorgelegten 25 µl Medium/well gegeben. Nach einer IKZ von einer Stunde im CO₂-Inkubator bei 37 °C, während der die vorhandenen neutralisierenden Antikörper mit den Viruspartikeln Immunkomplexe bildeten, wurde jedes well mit 100 µl GMK-Zellsuspension (2 x 10⁵ Zellen/ml) versetzt. Die lichtmikroskopische Untersuchung jedes wells auf das Vorhandensein eines virusspezifischen ZPEs erfolgte nach einer vier- bis fünftägigen Inkubation bei 37 °C/5 % CO₂. Die Serum-Verdünnungsstufe, bei der die vorhandenen Antikörper noch alle Viruspartikel neutralisierten und somit kein ZPE zu erkennen war, wurde als Antikörpertiter angegeben.

3.2.6 Virusisolation aus Gewebe

3.2.6.1 Mörser-Methode

Die tiefgefrorenen Gewebestücke von Herz, Milz und Pankreas wurden jeweils in einem Mörser zunächst nur mit sterilem Seesand und später mit einer entsprechenden Menge Zerreibungsmedium homogenisiert, so dass eine 2 %-ige (w/v) Lösung entstand. Bezugswert für die Herstellung dieser Lösungen war das Gewicht der einzelnen Organteile.

3.2.6.2 Mixermill-Methode

Hier wurden die tiefgefrorenen Gewebestücke der einzelnen Organe zusammen mit 1 ml Zerreibungsmedium und einer Metallkugel in ein Eppendorfröhrchen gegeben und mit Hilfe eines Retsch® Mixermill 300 (QIAGEN; 2-4x 1 min, 30 Schläge/s) homogenisiert. Entsprechend des Gewichts der einzelnen Organteile wurde zusätzlich soviel Zerreibungsmedium aufgefüllt, dass eine 2 %-ige (w/v) Lösung entstand.

Anschließend wurden die Homogenisate bei -20 °C tiefgefroren. Um einen vollständigen Aufschluss des Organs zu erreichen, wurden die Proben dreimal aufgetaut und wieder eingefroren. In den sich anschließenden TCID₅₀-Tests wurden jeweils 25 µl Probe eingesetzt.

- **Zerreibungsmedium:** MEM/E + 100 I.E. Penicillin und 0,1 % mg/ml Streptomycin + 2 % NKS

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Agarosegelelektrophorese

3.4.1.1 DNA-Gele

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurden 1-2 %-ige Agarose-Gele (in 0,5x TBE-Puffer) hergestellt. Um ein späteres Sichtbarwerden der aufgetrennten DNA-Banden zu gewährleisten, wurden den Agaroselösungen vor der Polymerisierung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden mit farbigem Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt und anschließend in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern (mit 0,5x TBE-Puffer) bei 100-120 V aufgetrennt. Ein Vermischen der Proben mit Ladepuffer war nicht erforderlich, wenn einer PCR-Reaktion der bereits gefärbte 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega) für die zugehörige GoTaq® Flexi DNA Polymerase zugesetzt wurde. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (Herolab E.A.S.Y. RH-3). Ein Abschätzen der Fragmentlängen war dabei durch einen mitgeführten DNA-Größenmarker möglich.

- **TBE-Puffer (0,5x):** 45 mM Tris/HCl pH 8,0; 45 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
- **Ladepuffer (6x):** 30 % Glycerol; 10 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau bzw. **5x DNA Loading Buffer Blue** (BIOLINE)
- **DNA-Größenmarker:** 5 µl/ Spur „HyperLadder I“ (BIOLINE)

3.4.1.2 RNA-Gele

Die aus eukaryotischen Zellen bzw. aus murinem Gewebe isolierte RNA wurde mit Hilfe von 1,5 %-igen Agarosegelen (in 10 mM Na-Phosphatpuffer, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) analysiert.

- **Na-Phosphatpuffer (10 mM):** 0,1 M Na₂HPO₄ und 0,1 M NaH₂PO₄ im Verhältnis 1:1 mischen und Gemisch 1:10 verdünnen

3.4.2 Quantifizierung von DNA und RNA

Um die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung zu bestimmen, wurde diese zunächst verdünnt und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Ausgehend von diesem Wert erfolgte die Berechnung nach folgenden Formeln:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50/1000$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40/1000$$

3.4.3 RT-PCR

Das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe einer retroviralen Reversen Transkriptase („SuperScript™ II RNase H reverse transcriptase“; Invitrogen). Da sowohl alle zellulären mRNA-Spezies als auch die virale RNA eine 3'-terminale Poly-A-Sequenz aufweisen, wurden aufgrund des verwendeten unspezifischen oligo-d(T)-Primers nur diese Strukturen in DNA umgeschrieben. Für die Reaktionen wurden 3 µg bzw. 5 µg RNA mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt und 1 µl oligo-d(T)-Primer (0,5 µg/µl) zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 70 °C und einem Abkühlen für 3 min auf Eis wurden pro Ansatz folgende Reagenzien zugegeben:

| | |
|------------------------------|--------|
| 5x FSB (First Strand Buffer) | 4 µl |
| dNTP`s (10 mM) | 2 µl |
| DDT (1 M) | 2 µl |
| Reverse Transkriptase | 0,5 µl |

Die sich anschließende Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe eines „Thermocyclers“ (PTC-200, MJ Research) in folgenden Inkubationsschritten:

10 min 25 °C/50 min 42 °C/5 min 95 °C

Für eine strangspezifische RT-PCR wurde anstelle des oligo-d(T)-Primers entweder 1 µl EV1-Primer (Nachweis viraler Negativ-RNA-Stränge) bzw. 1 µl EV2-Primer (Nachweis viraler Positiv-RNA-Stränge) eingesetzt.

- **DEPC-H₂O:** 0,1 % Diethylpyrocarbonat; 24 h rühren; 2x autoklavieren
- **RT-PCR-Reagenzien:** 5x First Strand Buffer, DDT, SuperScript™ II RNase H reverse transcriptase (Invitrogen); dNTP`s (Promega)

3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines „Thermocyclers“ (PTC-200, MJ Research) in zyklisch wiederholten Reaktionsschritten. Dabei waren Zyklusanzahl, Dauer der einzelnen Schritte sowie deren Temperatur zum einen von der Länge der zu amplifizierenden DNA und zum anderen von der Sequenz der verwendeten Primer abhängig. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch (siehe 3.4.1.1). Die Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

| | |
|--|----------------|
| cDNA/Template-DNA | 1-4 µl |
| 5xTaq-Puffer (ohne MgCl ₂) | 10 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5 µl |
| dNTP`s (10 mM) | 1 µl |
| 5`-/3`-Primer (30 µM) | je 1 µl |
| Taq-Polymerase | 0,25 µl |
| H ₂ O | 27,75-30,75 µl |

- **PCR-Reagenzien:** 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, MgCl₂, dNTP`s, GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)
- **mu β -Aktin-PCR:** (Amplikon: 582 bp)
3 min 94 °C//30 Zyklen: 1 min 94 °C/50 s 55 °C/50 s 72 °C//5 min 72 °C
- **VP1-PCR:** (Amplikon: 851 bp)
3 min 95 °C//30 Zyklen: 1 min 94 °C/50 s 56 °C/50 s 72 °C//7 min 72 °C
- **EV1-EV2-PCR:** (Amplikon: 145 bp)
3 min 95 °C//30 Zyklen: 50 s 95 °C/30 s 60 °C/30 s 72 °C//7 min 72 °C
- **CD19-PCR:** (Amplikon: 410 bp)
3 min 95 °C//30 Zyklen: 1 min 94 °C/50 s 59 °C/50 s 72 °C//7 min 72 °C

3.4.5 Real-time PCR

Zur Real-Time-Quantifizierung von cDNA wurde die LightCycler®-Technologie (Roche) und das „QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit“ (QIAGEN) nach Herstellerangaben genutzt. Dabei kam es nach der Bindung eines Farbstoffs (SYBR Green I) an vorhandene und während der PCR entstehende doppelsträngige DNA-Moleküle zu einem Fluoreszenzsignal, dessen Intensität detektiert und mittels geeigneter Software (LightCycler3 Run, Version 5.32) ausgewertet werden konnte. Die Reaktionen wurden wie folgt angesetzt und anschließend in Glaskapillaren überführt:

| | |
|---|----------------|
| 2x „QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix“ | 10 μ l |
| Nuclease-freies H ₂ O | 8 μ l |
| 5`-/3`-Primer (30 μ M) | je 0,5 μ l |
| cDNA | 1 μ l |

Im ersten Schritt aller verwendeten PCR-Programme wurde die im Master Mix enthaltene HotStar Taq-Polymerase durch ein Erhitzen der Proben auf 95 °C (15 min) aktiviert. Die sich anschließenden, auf das erwartete spezifische PCR-Produkt angepassten Zyklen bestanden jeweils aus Denaturierung/Anlagerung der Primer/Elongation/Abschmelzen von Primer-Dimeren und wurden wie folgt durchgeführt:

- **EV1-EV2:** 32 Zyklen: 15 s 94 °C/20 s 60 °C/20 s 72 °C/5 s 82 °C
→ es resultierte ein 145 bp großes, für Enteroviren spezifisches PCR-Produkt (455 nt - 600 nt im CV-Genom) mit einer spezifischen Schmelztemperatur $T_m = 85$ °C
- **huCAR:** 35 Zyklen: 15 s 94 °C/20 s 60 °C/20 s 72 °C/20 s 77 °C
→ es resultierte ein 151 bp großes, PCR-Produkt (859 nt - 1005 nt im huCAR-Gen) spezifisch für huCAR mit einer spezifischen Schmelztemperatur $T_m = 81$ °C

- **muCAR:** 35 Zyklen: 15 s 94 °C/20 s 60 °C/20 s 72 °C/20 s 78 °C
 → es resultierte ein 149 bp großes PCR-Produkt (363 nt - 511 nt im *muCAR*-Gen)
 spezifisch für den murinen CAR mit einer spezifischen Schmelztemperatur
 $T_m = 81\text{ °C}$

Die Detektion der entstehenden Fluoreszenzsignale erfolgte in jedem Zyklus nach dem Abschmelzen der Primer-Dimere.

Um die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte überprüfen zu können, wurde anschließend eine Schmelzkurve erstellt, bei der die Temperatur sehr langsam (0,2 °C/s) von einem niedrigen Wert auf einen hohen Wert angehoben wurde und eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung stattfand (0 min 94 °C/20 °C /s//1 min 50 °C/ 20 °C/s//0 min 94 °C/0,2 °C/s).

Die Quantifizierung der eingesetzten cDNA erfolgte durch Vergleich mit einer jeweiligen, zuvor etablierten Standardkurve unter Verwendung von standardisierten, durch Restriktionsverdau (siehe 3.4.8) linearisierten Plasmiden (siehe 3.4.6) (in den Verdünnungsstufen: 10^1 bis 10^8 Kopien/ μ l), welche die gewünschte Zielsequenz enthielten. Bei jedem Lauf wurde dafür zur internen Kontrolle dieses Plasmid in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen mitgeführt.

3.4.6 Plasmide

Tab. 3: Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

| Bezeichnung | Eigenschaft | Verwendung |
|---------------------------------------|--|---|
| pBKH3 (<i>Xho</i> I) | pBK-Derivat, welches für das gesamte CVB3H3-Genom kodiert | Standard-Plasmid zur real time-Quantifizierung viraler Genome |
| pcDNA3.1/mCAR (<i>Xba</i> I) | pcDNA3.1-Derivat, das die Sequenz des murinen <i>CAR</i> -Gens enthält | Standard-Plasmid zur real time-Quantifizierung von muCAR |
| pcDNA3/huCAR (<i>Hind</i> III) | pcDNA3-Derivat, das die Sequenz des humanen <i>CAR</i> -Gens enthält | Standard-Plasmid zur real time-Quantifizierung von huCAR |

3.4.7 Primer

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Phosphoamid-Methode mit dem Expetide Nr. 8909 (Firma PerSeptive Biosystems) von Dr. E. Birch-Hirschfeld am Institut für Virologie und Antivirale Therapie (FSU Jena) synthetisiert.

Tab. 4: Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (* nach [346]).

| Bezeichnung | Sequenz | Verwendung |
|-----------------------|---|---|
| VP1-5' | 5' - GGC CCA GTG GAA GAC GCG - 3' | Nachweis von VP1 |
| VP1-3' | 5' - AAA TGC GCC CGT ATT TGT CAT TG - 3' | Nachweis von VP1 |
| mu- β -Aktin 5' | 5' - GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA - 3' | Nachweis von mu β -Aktin |
| mu- β -Aktin 3' | 5' - CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC - 3' | Nachweis von mu β -Aktin |
| EV1 * | 5' - CCC TGA ATG CGG CTA ATC C - 3' | real time-PCR; Nachweis viraler Negativ-RNA- Stränge |
| EV2 * | 5' - ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA - 3' | real time-PCR; Nachweis viraler Positiv-RNA- Stränge |
| muCAR-LC 5' | 5' - AGT GAA GAA AGC CCC TGG GGT TG - 3' | real time-PCR muCAR |
| muCAR-LC 3' | 5' - GTG GAA GGG AGC CTT CCT TG - 3' | real time-PCR muCAR |
| CAR-LC7-F | 5' - GCT TGC TCT AGC GCT CAT TGG TCT TAT C - 3' | real time-PCR huCAR |
| CAR-LC7-R | 5' - CCG ATG TAG CTT CTG GCA GTG GAC GTA - 3' | real time-PCR huCAR |
| oligo(d)T | 5' - TTTTTTTTTTTTTTTTTT - 3' | Reverse Transkription |
| CD19-5' | 5' - ATG CCA TCT CCT CTC CCT GTC - 3' | Nachweis von CD19 in murinen Geweben |
| CD19-3' | 5' - TTA GCC CAC ACA TAC AGC TGG - 3' | Nachweis von CD19 in murinen Geweben |

3.4.8 Restriktionsverdau von Plasmiden

Für die Linearisierung von Plasmiden in Vorbereitung auf deren Einsatz in real time-PCR-Reaktionen wurden ausgewählte Restriktionsenzyme verwendet, welche nur an einer spezifischen Stelle den jeweiligen Vektor hydrolytisch spalteten. Der Restriktionsansatz aus Plasmid-DNA, Enzym, Puffer und destilliertem Wasser wurde bei 37 °C für 1-2 h in-

kubiert. Nach Überprüfung der Vollständigkeit des Verdaus mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte eine Reinigung der DNA entweder über das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) oder über „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN).

- **Restriktionsenzyme:** *Xho* I, *Xba* I, *Hind* III in Verbindung mit den entsprechend durch den Anbieter bereitgestellten 10x-Puffern (Roche)

3.4.9 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten zur Beseitigung störender Puffer und Proteine sowie von Primern (< 40 Basen) erfolgte, den Herstellerangaben entsprechend, mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN).

3.4.10 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellkulturen bzw. primären B-Zellen wurden diese zunächst pelletiert und anschließend mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (QIAGEN) den Herstellerangaben entsprechend isoliert.

3.4.11 RNA-Isolation aus Organgewebe

Die in 400 µl „RNA later“-Lösung bei 4 °C gelagerten murinen Organproben von Pankreas, Milz oder Herz wurden zunächst jeweils in 1 ml Lösung I (Tab. 5) aufgenommen. Nach Zugabe einer Metallkugel erfolgte mit Hilfe eines Retsch® Mixermill 300 (QIAGEN; 2x 1 min, 30 Schläge/s) eine Homogenisierung der Proben und anschließend ein Zentrifugieren für 3 min bei 10000 U/min (4 °C). Danach wurden diesem Gemisch 1,3 ml Lösung II (Tab. 5) zugefügt, 30 s gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit bildeten sich zwei Phasen aus, die sich durch eine 15-minütige Zentrifugation (10000 U/min, 4 °C) stärker trennten. Da sich die RNA in der oberen wässrigen Phase befand, wurde diese abgenommen und 1:1 (v/v) mit kaltem Isopropanol (100 %) versetzt. Nach einer IKZ von 2-4 Stunden bei -20 °C erfolgte eine weitere Zentrifugation der Proben für 15 min bei 10000 U/min (4 °C). Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das RNA-Pellet in 300 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl kaltem Isopropanol (100 %) erfolgte dann eine zweite Fällung der RNA über Nacht bei -20 °C. Am Folgetag wurde mittels einer Zentrifugation (30 min, 13000 U/min, 4 °C) die RNA sedimentiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 0,5 ml eiskaltem 70%-igen Ethanol gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift für 15 min bei 10000 U/min (4 °C) zentrifugiert wurde. Nach Trocknung der RNA-Pellets im Vakuum erfolgte ein Resuspendieren in 30 µl-100 µl DEPC-H₂O und eine Inkubation der RNA für 30 min auf Eis. Anschließend wurde die Konzentration der entstandenen RNA-Lösung (siehe 3.4.2) und deren Reinheitsgrad be-

stimmt, welcher sich aus dem Quotienten der gemessenen OD-Werte bei 260 nm und 280 nm ergab. Ein Wert von 1,7-1,9 wies auf einen hohen Reinheitsgrad hin, während bei Proteinverunreinigungen oder zu hohen Salzkonzentrationen Werte von unter 1,7 bzw. höher als 1,9 erreicht wurden.

Tab. 5: Arbeitslösungen für die Isolation von RNA aus Organgewebe.

| | |
|----------------------------|--|
| Lösung I | 4,0 M Guanidinisothiocyanat; 17 mM Na-N-Laurylsarcosin; 50 mM Na-Citrat; pH 7,0 (mit 1 M NaOH); filtrieren mit sterilem Glas-Mikro-Filterpapier (Whatman, Porengröße: 22 µm); vor Versuchsbeginn 26 ml Lösung mit 188 µl β-Mercaptoethanol versetzen |
| Lösung II | Chloroform-Phenol-Lösung: 10 ml Phenol; 1 ml Na-Acetat (3 M pH 4,0); 2 ml Chloroform:Isoamyl Alkohol (24:1) |
| DEPC-H₂O | 0,1 % Diethylpyrocarbonat; 24 h rühren; 2x autoklavieren |

3.4.12 Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Isolation der Gesamtproteinmenge aus Raji- oder primären B-Zellen wurden diese zunächst pelletiert und anschließend in NTE-Puffer resuspendiert. Die Zugabe von 0,5 % NP-40 und ein Vortexen für 30 s ermöglichten einen vollständigen Aufschluss der Zellen. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation (14000 U/min, 4 °C) wurde der klare proteinhaltige Zelleextrakt abgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Bradford: Dazu wurden die Proteinproben vorverdünnt und in 2 Parallelen zu je 100 µl in eine 96-well Zellkulturplatte pipettiert, deren Vertiefungen zuvor ebenfalls mit je 100 µl Bio-Rad-Farbstoff befüllt worden waren. Nach kurzem Schütteln der Platte erfolgte die Extinktionsmessung bei 570 nm („Mikroplate Reader Dynatech MR5000“). Eine identisch behandelte Proteinstandard-Verdünnungsreihe mit 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 und 15 µg/ml „bovine serum albumin“ (BSA) à 100 µl in 2 Parallelen diente zum erstellen einer Eichgerade, anhand derer die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt wurden.

- **NTE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl
- **NP-40 („nonionic detergent-P40“):** 10%-ige Stammlösung (Sigma)
- **Bio-Rad-Farbstoff:** Bio-Rad-Farbstoffkonzentrat 1:5 verdünnt und filtriert
- **BSA:** Stammlösung 1,4 mg/ml in Aliquots bei -20 °C

3.4.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung eines aus eukaryotischen Zellen gewonnenen Proteingemischs gemäß der molaren Masse wurden gleiche Mengen der jeweils zu untersuchenden Proben mit Protein-Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Dabei führte zum einen β -Mercaptoethanol zu einer Reduktion der Disulfidbrücken; zum anderen kam es durch das enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Denaturierung und zu einer einheitlichen negativen Ladung der Proteine. Anschließend wurden die vorbehandelten Proteingemische und ein Molekulargewichtsmarker auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, welches aus einem, die Ladetaschen enthaltenden 5 %-igen Sammelgel und einem, je nach Proteingröße variierenden, unteren Trenngel bestand. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte entweder in einer „Mini-PROTEAN“-Gelapparatur (Bio-Rad) oder in einer „PROTEAN II xi Cell“- Gelapparatur (Bio-Rad) bei 100-200 V.

- **Sammelgel (1,6 ml/8 ml):** 5 % Acrylamidlösung (30 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid), 1x Sammelgelpuffer (4x: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS), 20,5 μ l/102,5 μ l 10 % APS (Ammoniumpersulfat), 2 μ l/10 μ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin)
- **Trenngel (4,8 ml/24 ml):** 12,5 %-15 % Acrylamidlösung (30 % Acrylamid; 0,8 % Methylenbisacrylamid), 1x Trenngelpuffer (4x: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS), 21,5 μ l/107,5 μ l APS, 5,5 μ l/27,5 μ l TEMED
- **Probenpuffer (2x):** 100 mM Tris/HCl pH 6,0; 4 % SDS; 10 % β -Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 0,1 % Bromphenolblau
- **Elektrophoreselaufpuffer (10x):** 250 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1% SDS
- **Molekulargewichtsmarker:** 5 μ l/25 μ l/Spur (Fermentas: „Page Ruler Prestained Protein Ladder“)

3.4.14 Western Blot

Um ein bestimmtes Protein des Zellextraktes mittels Western Blot spezifisch zu detektieren, wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische zunächst elektrophoretisch (konstant 12 V, über Nacht, unter Kühlung) in Blotpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell PROTRAN: BA85, Porengröße 0,45 μ m) transferiert. Am Folgetag wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation in TBS-Puffer mit 5 % Magermilch (MM) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Zugabe eines für das gewünschte Protein spezifischen, primären Antikörpers in entsprechender Verdünnung mit TBST-Puffer/1 % MM und eine Inkubation für 1-2 h bei RT (EGFP) bzw. über Nacht bei 4 °C (β -Aktin). Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBST-Puffer wurde die Membran für weitere 1-2 h bei RT mit einem an Alkalische Phosphatase

gekoppelten, sekundären Antikörper inkubiert, der gemäß Herstellerangaben in TBST-Puffer/1 % MM verdünnt war. Es folgten drei weitere Waschschritte für jeweils 10 min mit TBST-Puffer und die Detektion der Antikörper-markierten Proteine durch Substratzugabe (NBT/BCIP) und die daraus resultierende Farbreaktion. Dieser Prozess beruhte dabei auf der enzymatischen Dephosphorylierung von BCIP und dessen Oxidation, wobei NBT als Oxidationsmittel diente. Die Membran wurde dazu in Substratlösung eingelegt und bis zur gewünschten Intensität der Signale im Dunkeln inkubiert (2-120 min). Ein Stoppen der Reaktion erfolgte durch Spülen des Blots mit Wasser. Anschließend wurde die Membran auf Filterpapier getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

- **Blotpuffer:** 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
- **TBST-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20
- **TBS-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl
- **Substratlösung** (ausreichend für 2 Blots): 1 Tablette NBT/BCIP ready-to-use (Roche) aufgelöst in 15 ml Wasser
- **primäre Antikörper:**
 - Rabbit-anti- **β -Actin**: Cell Signalling Technology (13E5), monoklonal; **1:1000**
 - Mouse-anti-**GFP**: BOEHRINGER MANNHEIM (7.1/13.1; # 1814460), monoklonal, 0,4 mg/ml; **1:450**
 - Rabbit-anti-**CAR**: Santa Cruz Biotechnology (H-300: sc-15405), polyklonal; **1:200**
- **sekundäre Antikörper:**
 - Rabbit-anti-**Mouse**-AP: DPC BIERMANN (# R1253AP), polyklonal, 0,7 mg/ml; **1:2000**
 - Goat-anti-**Rabbit**-AP: Acris Antibodies (# R1364AP), polyklonal, 1,0 mg/ml; **1:1000**

3.4.15 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Die aseptisch entnommenen Milzstücke wurden zunächst in „Cryomatrix“-Medium (Thermo Scientific) eingebettet und bei -80 °C tiefgefroren. Mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Jung SM 2000R, LEICA) wurden 10 µm dünne Schnitte des eingebetteten Organs angefertigt und diese für 2 h luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit Aceton (3 min, RT), ein Waschen mit Hanks-Medium (Lonza) und zur Blockierung der zellulären Peroxidasen eine Behandlung mit 0,04 %igem Wasserstoffperoxid. Dann wurden die Schnitte nacheinander in Avidin-Lösung, Biotin-Lösung und 2 %iger Magermilchlösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für je 30 min bei RT inkubiert. Zwischen diesen Schritten erfolgten jeweils drei Waschschritte mit Hanks-Medium (3 min, RT). Anschlie-

ßend erfolgte die Zugabe eines für den B-Zell-Oberflächenmarker CD19 spezifischen, primären Antikörpers in entsprechender Verdünnung und eine Inkubation für 14 h bei 4 °C. Nach einem 12-minütigen Waschschriff mit Hanks-Medium wurden die Schnitte für weitere 30 min bei RT mit einem an Biotin gekoppelten, sekundären Antikörper inkubiert, der gemäß Herstellerangaben verdünnt war. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit Hanks-Medium (12 min, RT) und die Detektion der markierten Proteine über eine Farbreaktion, welche durch eine Behandlung der Schnitte mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat und anschließend mit dem „ACE Red peroxidase substrat kit“ (Camm Labor-Service) zustande kam.

- **primärer Antikörper:** Rat-anti-Mouse **CD19**: Pharmingen (1D3), monoklonal, 0,2 mg/ml; **1:800**
- **sekundärer Antikörper:** Horse-anti-Rat-**Biotin**: Vector Laboratories, polyklonal; **1:1000**

3.4.16 Immunhistochemische Detektion viraler Antigene – APAAP-Methode

Die Fähigkeit des verwendeten murinen Anti-CVB3-Serums in verschiedenen Verdünnungsstufen noch spezifisch coxsackievirale Antigene zu erkennen, wurde mit Hilfe einer Alkalischen Phosphatase Anti-Alkalischen Phosphatase-Methode (APAAP) untersucht. Das diesem Verfahren zu Grunde liegende Prinzip beruht auf der Inkubation virusinfizierter, fixierter Zellen mit einem spezifischen, gegen das gewünschte virale Antigen gerichteten Maus-Antikörper (Primärantikörper) und der sich anschließenden Detektionsreaktion. Dabei dient zunächst ein gegen alle murinen Immunglobulin-Isotypen gerichteter Link-Antikörper (Sekundärantikörper, Kanninchen-Anti-Maus) als Brücke zwischen Primärantikörper und dem APAAP-Komplex. Dieser lösliche Immunkomplex besteht aus einem monoklonalen murinen Anti-AP-Antikörper und zwei an diesen gebundenen Molekülen AP, welche die im Substrat enthaltenen Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysieren. Die entstandenen Phenole reagieren dann mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche rötlich erscheinende Azofarbstoffe.

In die 8 Vertiefungen eines Objektträgers mit aufgesetzten Kammern („chamber slide“) wurden zunächst GMK-Zellen gesät, welche nach 2-tägiger Inkubation mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert wurden. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wurden die Virussuspensionen entfernt, die Zellrasen zur Entfernung ungebundener Partikel dreimal mit Kulturmedium gewaschen und anschließend zur weiteren Inkubation bei 37 °C/5 % CO₂ mit frischem Medium (300 µl/Kammer) überschichtet. Mit dem Auftreten erster Anzeichen für einen ZPE (4-5 h p. i.) erfolgte dann die Fixierung der Zellen, indem diese einmal mit PBS

gewaschen und nachfolgend mit Paraformaldehyd für 30 min bei RT inkubiert wurden. Nach 3 Waschschritten mit PBS fand eine Lagerung des Objektträgers über Nacht bei 4 °C (dabei Kammern mit PBS überschichtet) und am Folgetag die Durchführung des APAAP-Verfahrens mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Nachweissystems statt, wobei die Vertiefungen der Objektträger mit je 150 µl der entsprechenden Versuchsreagenzien versetzt wurden. Zunächst wurden die fixierten Zellen mit TBS (5 min RT) gewaschen und anschließend für 20 min bei RT mit TBS + 1 % BSA inkubiert. Danach erfolgte eine Behandlung (IKZ: 30 min) der Zellen mit unterschiedlich konzentriertem murinen Anti-CVB3-Serum (Verdünnungsstufen: 1:20/40/100/250/500/1000 in TBS + 1 % BSA) bzw. 1:20-verdünntem Kontroll-Serum ohne virusspezifische Antikörper. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden die Zellen einer Kammer ausschließlich mit TBS + 1 % BSA versetzt. Nach 3 Waschschritten (je 2 min, RT) mit TBS + 0,05 % Saponin wurden die Zellen für 30 min bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert und dann wiederum dreimal mit TBS + 0,05 % Saponin (je 2 min, RT) gewaschen. Anschließend erfolgten die Zugabe des APAAP-Komplexes (IKZ: 1 h) und ein Spülen der Zellen mit reiner TBS-Lösung (3x für je 2 min, RT). Die nachfolgend zugesetzte Substratlösung (IKZ: ca. 5 min), welche unter anderem Levamisol zur Inaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase sowie 3 verschiedene Chromogene enthielt, diente zur Detektion der gebundenen Antikörper. Nach 3 Waschschritten mit TBS wurde der Objektträger getrocknet und zur dauerhaften Lagerung mit einem Eindeckmedium versiegelt.

- **„chamber slides“:** aus Kunststoff, 8 Kammern (Nunc)
- **Paraformaldehyd:** 4 % in PBS
- **TBS:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6 (eingestellt mit HCl)
- **BSA** (Serva)
- **Saponin:** 10 %-ige Stammlösung (Sigma)
- **Dako REAL™ Detection System, APAAP, Mouse** (Dako)
- **Eindeckmedium:** Immu-Mount (Shandon)

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Versuchstiere

Alle verwendeten Versuchstiere entstammten Inzuchtkolonien verschiedener immunkompetenter Mausstämmen und waren 8-10 Wochen alt.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Versuchstiere.

| Stamm | Verwendung |
|-------------|---|
| BALB/c (♂) | <ul style="list-style-type: none"> Isolation CD19⁺ B-Zellen aus der Milz und nachfolgende <i>In vitro</i>-Experimente; Infektionsexperimente |
| C57BL/6 (♂) | <ul style="list-style-type: none"> Isolation CD19⁺ B-Zellen aus der Milz für den Nachweis von muCAR Generierung des murinen Anti-CVB3-Serums |

3.5.2 Infektions- und Behandlungsprotokolle

Für alle *In vivo*-Untersuchungen wurden Gruppen aus 3-4 männlichen BALB/c-Mäusen mit der jeweils angegebenen Menge an CVB3H3 oder CVB3M2 intraperitoneal (i. p.) infiziert. Die nachfolgende Inkubationsdauer bzw. gegebenenfalls Reihenfolge und Abstand aufeinander folgender Infektionen richtete sich dabei nach der entsprechenden Fragestellung. Zumeist wurde jedoch 3 d nach der CVB3H3-Infektion die Sektion der Tiere durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Anzahl an CD19⁺ B-Zellen infiziert vorlag. War eine Behandlung der Mäuse mit einem der beiden Pan-Caspase-Inhibitoren (25 mg/kg Lebendgewicht in 25 µl DMSO) bzw. mit DMSO als Kontrolle vorgesehen, erfolgte diese durch intravenöse (i. v.) Applikation ebenfalls 3 d nach CVB3H3-Infektion. Die Sektion dieser Tiere wurde 6 h nach der Inhibitor-Behandlung durchgeführt. Für die Opsonierung von CVB3H3 wurde die benötigte Menge an Virussuspension den *In vitro*-Experimenten (3.1.8.1) entsprechend für 1 h bei 37 °C mit verdünntem (1:100) Anti-CVB3-Serum vorinkubiert und anschließend i. p. verabreicht.

3.5.3 Sektion der Versuchstiere und Organentnahme

Nach einer Betäubung mittels Diethylether wurden die Tiere abgetötet und anschließend präpariert, wobei verschiedene Organe und Blut der Fragestellung entsprechend entnommen und gegebenenfalls geteilt wurden. In der Regel erfolgte jedoch nach Durchtrennen der Aorta und Entnahme des Herzens zunächst die Blutentnahme. Milz und Pankreas wurden ebenfalls steril entnommen und wie das Herz geteilt sowie jeweils gewogen. Um vorhandenes Blut zu entfernen und somit eine Kontamination mit Viren aus der Peripherie des Organs auszuschließen, wurden die für die Viruskonzentrationsbestimmung vorgesehenen Organteile zunächst in Natriumchloridlösung eingelegt. Nach kurzer Inkubation

wurde die Lösung wieder entfernt und die Organteile bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Für die RNA-Isolierung bestimmte Organstücke wurden in sterile Gefrier Röhrchen überführt, welche zuvor mit 400 µl „RNA-later“-Lösung – einer Substanz zur RNA-Stabilisierung – versetzt worden waren. Milzgewebe, aus dem durch MACS-Separation primäre CD19⁺ B-Lymphozyten isoliert werden sollten, wurden innerhalb einer Versuchsgruppe gepoolt und in 6 ml Zellkulturmedium auf Eis bis zur Homogenisation aufbewahrt. Das gewonnene Blut wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 3000 U/min in zelluläre Blutbestandteile und Serum separiert, wobei letzteres vorsichtig abgenommen und anschließend bei -20 °C eingefroren wurde.

- **Natriumchloridlösung:** 0,9 % + Penicillin und Streptomycin
- **„RNA-later“-Lösung** (QIAGEN)
- **Zellkulturmedium für primäre B-Lymphozyten:** RPMI 1640-Medium (siehe 3.1.1)

4. ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zur aktiven Replikation von CVB3 in B-Lymphozyten

Neben Zielorganen wie Pankreas, Herzgewebe oder Zentralnervensystem (ZNS) ist CVB3 in der Lage, auch verschiedene Zellen des Immunsystems zu infizieren. Dabei kann das Virus im murinen Tiermodell z. B. in Makrophagen und T-Zellen, aber auch in B-Lymphozyten der Milz nachgewiesen werden. Ob jedoch in diesen Zellen tatsächlich eine aktive Virusreplikation stattfindet und welche viralen oder zellulären Faktoren eine solche Infektion ermöglichen, unterstützen und beeinflussen, wurde bisher nur wenig untersucht.

4.1.1 CVB3-Replikation in der humanen Zelllinie Raji

Um eine aktive Replikation von CVB3 in den verwendeten Lymphozyten nachweisen zu können, erfolgte die Infektion der Zellen mit einer rekombinanten CV-Variante – CVB3H3/EGFP [85, 308], welche das Reporterprotein EGFP bildet. Da die entsprechende Gensequenz dieses Proteins zusammen mit einer künstlich eingebrachten Schnittstelle für die virale Protease 3C direkt vor die für das Strukturprotein VP4 kodierende Region inseriert wurde, wird EGFP gleichzeitig mit den viralen Proteinen translatiert und nachfolgend vom Polyprotein proteolytisch abgespalten. Kann EGFP nach einer Infektion detektiert werden, ist demnach von einer aktiven Virusvermehrung innerhalb der infizierten Zelle auszugehen. Zunächst wurde die als für CVB3 empfänglich beschriebene humane Zelllinie Raji mit der rekombinanten Variante CVB3H3/EGFP (m.o.i. 1) inkubiert. Wie Abbildung 5 zeigt, waren unter Fluoreszenzbedingungen bereits 7 h p. i. erste infizierte Zellen durch eine deutliche Expression des Reporterproteins im Zytoplasma sichtbar.

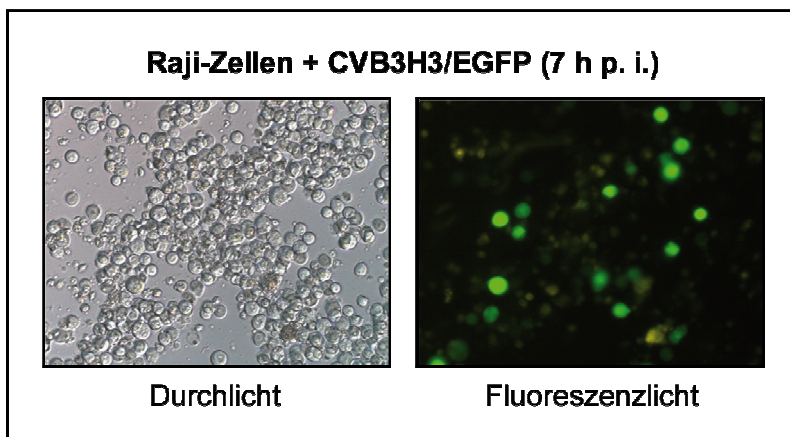


Abb. 5: Nachweis der Replikation von CVB3 in humanen Raji-Zellen. Raji-Zellen wurden mit der rekombinanten Virusvariante CVB3 H3/EGFP (m.o.i. 1) infiziert, welche während der Replikation EGFP bildet. Die licht- bzw. fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte 7 h p. i. (Vergrößerung: 400x).

4.1.2 CVB3-Replikation in primären murinen CD19⁺ B-Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit auch primäre murine B-Lymphozyten empfänglich für eine CVB3-Infektion sind und ob nachfolgend im Inneren dieser Zellen ebenfalls eine aktive virale Replikation stattfindet. Dafür wurden zunächst Milzgewebe männlicher BALB/c-Mäuse zu Einzelzellsuspensionen aufgeschlossen. Unter Verwendung eines magnetischen Zellsortierungssystems (MACS-Technologie) und Magnetpartikel-gekoppelter Antikörper gegen den spezifischen B-Zell-Marker CD19 erfolgte anschließend eine Separation der CD19⁺ Population.

Um sicherzustellen, dass durch diese Selektions-Methode ausschließlich CD19⁺ Zellen isoliert werden, erfolgte eine Inkubation der zu trennenden Milzlymphozyten mit einem an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gebundenen Antikörper, der ebenfalls gegen CD19 gerichtet war. Die anschließend positiv selektierten Zellen wurden dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops auf das Vorhandensein von FITC-Antikörper-markiertem CD19 untersucht. Abbildung 6A zeigt, dass die Zelloberflächen nahezu aller gewonnenen Zellen eine deutliche, für FITC typische, Grünfärbung aufwiesen. Nach Auszählen der fluoreszierenden Zellen und einem Vergleich mit der Gesamtzellzahl wurde eine Spezifität der Methode für die Isolierung von CD19⁺ Zellen von > 99,9 % ermittelt.

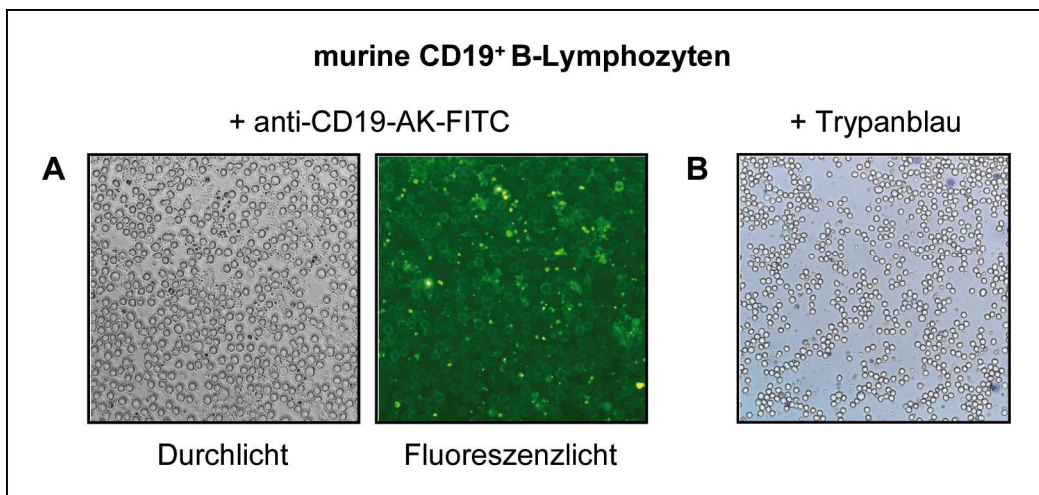


Abb. 6: Spezifität der Isolation CD19⁺ B-Lymphozyten durch MACS und Vitalitätstest. Aus murinem Milzgewebe gewonnene Einzelzellsuspensionen wurden sowohl mit FITC-markierten als auch mit Micro Bead-gekoppelten Antikörpern gegen den B-Zell-Marker CD19 versetzt. Anschließend erfolgte eine Separation der CD19⁺ B-Zellpopulation mittels MACS-Technologie. Unmittelbar danach wurden die isolierten Zellen **(A)** zur Bestimmung der FITC-positiven Lymphozyten an der Gesamtzellzahl licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch untersucht (ursprüngliche Vergrößerung: 400x) oder **(B)** mit Trypanblau gefärbt, um den Vitalzustand der isolierten Lymphozyten festzustellen.

Durch eine anschließende Trypanblaufärbung wurde zusätzlich die Vitalität der gewonnenen Zellen bestimmt (Abb. 6B). Nahezu alle Lymphozyten wiesen dabei keine Blaufärbung des Zytoplasmas und eine intakte Morphologie auf. Analog zur Infektion von Raji-Zellen wurden die murinen Lymphozyten dann gleichermaßen mit CVB3H3/EGFP infiziert (m.o.i. 2,5) und ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei war jedoch zu keinem Zeitpunkt p. i. eine typische EGFP-Fluoreszenz sichtbar (Daten nicht dargestellt). Daraufhin erfolgte nach einer Wiederholung des Versuchsansatzes, 3 d p. i. eine Analyse der infizierten Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie. CVB3H3/EGFP-infizierte Raji-Zellen (m.o.i. 1) wurden dabei aufgrund der bereits nachgewiesenen Empfänglichkeit für das Virus als EGFP-Fluoreszenz-Referenz herangezogen (Abb. 7), wobei wie erwartet nach nur 20 h IKZ bereits 48 % dieser Zellen eine deutlich messbare Fluoreszenz aufwiesen.

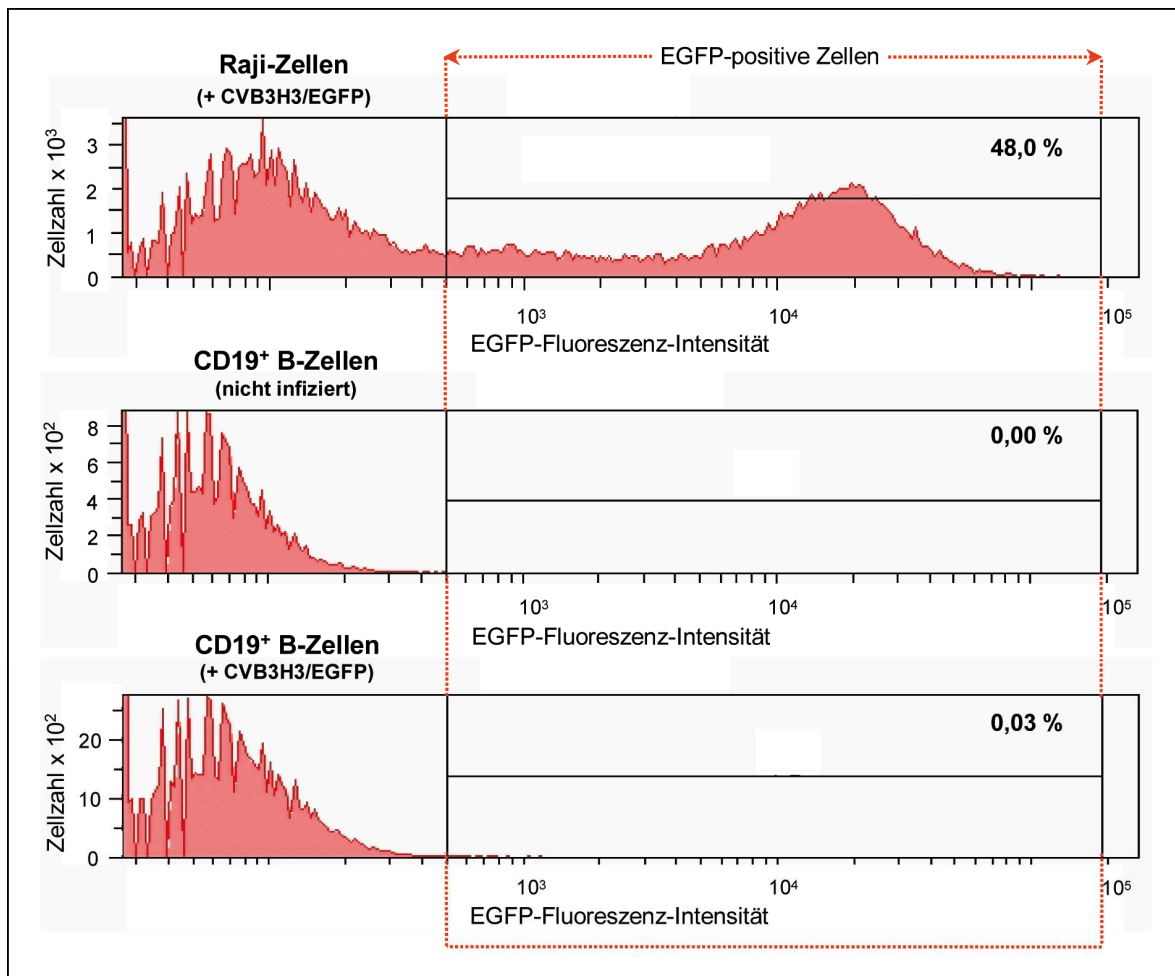


Abb. 7: Durchflusszytometrie CVB3H3/EGFP-infizierter Zellen. Murine CD19⁺ B-Lymphozyten wurden entweder für 3 d mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) inkubiert oder blieben unbehandelt. Als Positivkontrolle dienen CVB3H3/EGFP-infizierte humane Raji-Zellen (IKZ: 20 h; m.o.i. 1). Anschließend wurde der Anteil grün fluoreszierender Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

Im Gegensatz dazu konnten, trotz mehrmaliger Wiederholung des Versuchs, sowohl in den nicht infizierten Kontroll- als auch in den virusbehandelten CD19⁺ B-Lymphozyten-Kulturen keine bzw. nur extrem wenige (0,03 %) Zellen detektiert werden, deren EGFP-Fluoreszenz in dem zuvor festgelegten Referenz-Bereich lag.

Da basierend auf Studien von Mena et al., 1999 vermutet wurde, dass tatsächlich nur sehr wenige CD19⁺ Milz-B-Lymphozyten empfänglich für CVB3 sind, erfolgte eine zusätzliche Untersuchung der viralen EGFP-Expression in diesen Zellen mittels Western Blot-Analyse [232]. Dafür wurden wiederum primäre CD19⁺ B-Zellen aus murinen Milzen mit CVB3H3/EGFP infiziert und für 2 d bzw. 3 d inkubiert. Nach Isolation des Gesamtproteins und Auftrennung durch SDS-PAGE wurde ein monoklonaler gegen das 27 kDa große EGFP gerichteter Antikörper eingesetzt. In Abbildung 8 ist erkennbar, dass bei beiden Proben aus CVB3H3/EGFP-infizierten Zellkulturen ein, sich mit zunehmender IKZ intensifizierendes, spezifisches EGFP-Signal auftrat, welches bei nicht infizierten Kontrollkulturen ausblieb. Der Nachweis gleicher Mengen an zellulärem β -Aktin (45 kDa) belegte den Einsatz gleicher Mengen an Protein pro Probe.

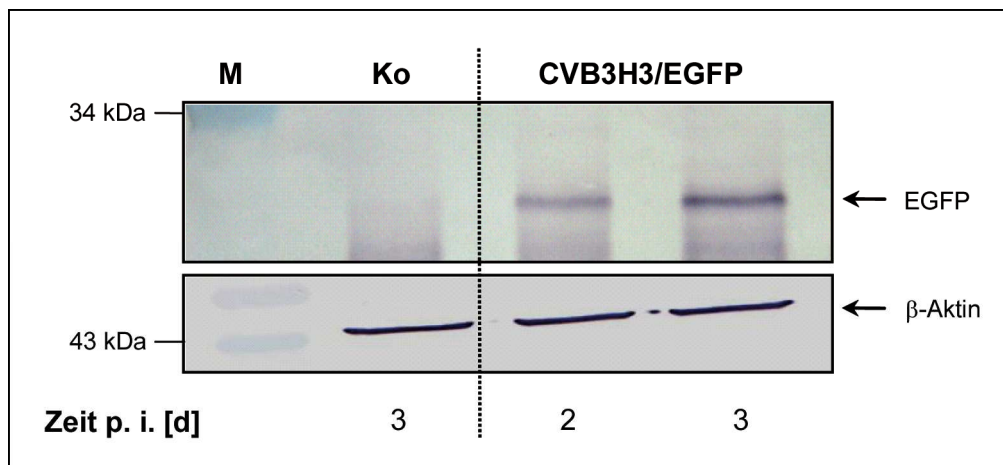


Abb. 8: Nachweis der aktiven Replikation von CVB3 in primären murinen CD19⁺ B-Lymphozyten des Milzgewebes. Die murinen B-Zellen wurden für 2 d bzw. 3 d mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) inkubiert oder blieben nicht infiziert [Ko]. Für die Western Blot-Analyse wurden je 390 μ g (EGFP) bzw. 16 μ g Protein (β -Aktin) auf 12,5 %-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und die jeweiligen Proteine anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert (spezifische Signale: EGFP 27 kDa; β -Aktin 45 kDa; M: Proteinmarker).

4.1.3 CVB3-Replikation in primären humanen CD19⁺ B-Zellen

Da die Pathogenese einer CVB3-Infektion im murinen Tiermodell stark einer solchen beim Menschen ähnelt, sollten im gleichen experimentellen Aufbau auch primäre humane CD19⁺ B-Lymphozyten hinsichtlich einer möglichen Empfänglichkeit für das Virus untersucht werden. Diese wurden mit Hilfe von MACS und an Magnetpartikel-gekoppelten An-

tikörpern gegen humanes CD19 aus Lymphozytenkonzentraten gesunder Blutspender gewonnen. Nach 2- bzw. 3-tägiger Inkubation mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) und anschließendem Nachweis der viralen EGFP-Produktion mittels Western Blot-Analyse zeigte sich, dass auch hier nur in virusinfizierten Kulturen mit fortschreitender Infektionsdauer ein sich intensivierendes spezifisches EGFP-Signal bei 27 kDa detektierbar war (Abb. 9). Die parallele Analyse der zellulären β -Aktin-Konzentrationen bei 45 kDa bestätigte wiederum die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben.

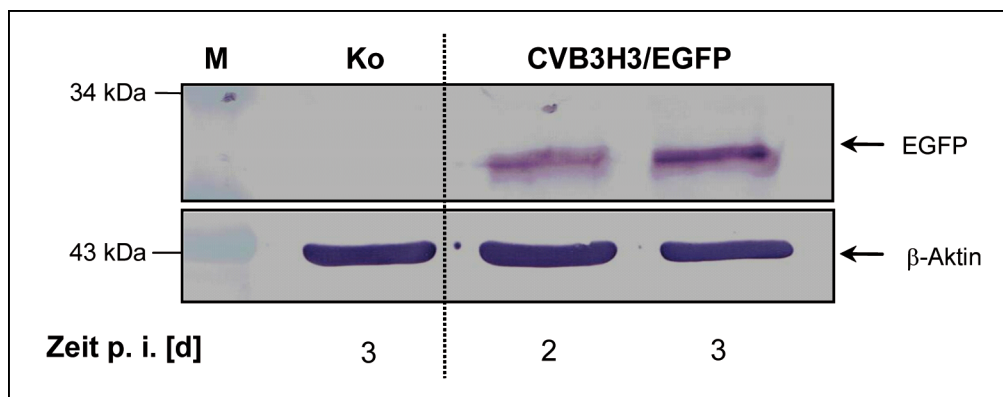


Abb. 9: Nachweis der aktiven Replikation von CVB3 in primären humanen CD19⁺ B-Lymphozyten des peripheren Blutes. Zu den angegebenen Zeiten nach einer Infektion humaner B-Zellen mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) wurden je 250 μ g (EGFP) bzw. 50 μ g Protein (β -Aktin) auf einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte anschließend während einer Western Blot-Analyse mit Hilfe spezifischer Antikörper (spezifische Signale: EGFP 27 kDa; β -Aktin 45 kDa; Ko: nicht infizierte Kontrollzellen M: Proteinmarker).

4.2 Untersuchungen zur Aufnahme von CVB3 in B-Lymphozyten

4.2.1 Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors in B-Zellen

Während ihres Vermehrungszyklus binden CV der Gruppe B, vermittelt durch eine canyonartige Struktur im viralen Kapsid [274], in der Regel an zelluläre Oberflächenmoleküle, um anschließend durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzellen einzudringen. Dabei dienen sogenannte „accessory factors“, wie der „decay-accelerating factor“ (DAF/CD55) [20, 299] oder verschiedene modifizierte Heparan-Sulfate [382, 383] als Co-rezeptoren, indem sie zwar als Adsorptions- jedoch nicht als Eintrittsrezeptoren fungieren. Beide Funktionen, d. h. Adhäsion und Internalisierung, werden bei allen sechs Coxsackie-B-Serotypen durch den humanen bzw. murinen CAR vermittelt [18, 19, 334], dessen Verteilungsmuster jedoch spezie-, gewebs- und altersabhängig ist [162, 239, 248, 334]. Die Expression von CAR bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen und primären B-Zelltypen wurde daher sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht.

4.2.1.1 CAR-Transkription

Für den Nachweis der Transkription des murinen *CAR*-Gens erfolgte eine Isolierung der Gesamt-RNA sowohl aus Milzlymphozyten-Konzentraten als auch aus murinen CD19⁺ B-Zellen. Als Positivkontrolle diente RNA aus Pankreas und Herz nicht infizierter Kontrollmäuse, da diese Gewebe während einer CVB3-Infektion Zielorgane für das Virus darstellen und als CAR-positiv beschrieben sind [19, 231, 334]. Weiterhin wurden zwei genetisch verschiedene Mausstämme – BALB/c und C57BL/6 – auf eine mögliche *CAR*-Transkription in den einzelnen Zellen und Geweben getestet. Nach dem Umschreiben der mRNA-Spezies in cDNA wurden kurze Sequenzen des murinen *CAR*-Gens mittels real time-PCR amplifiziert und quantifiziert (Abb. 10).

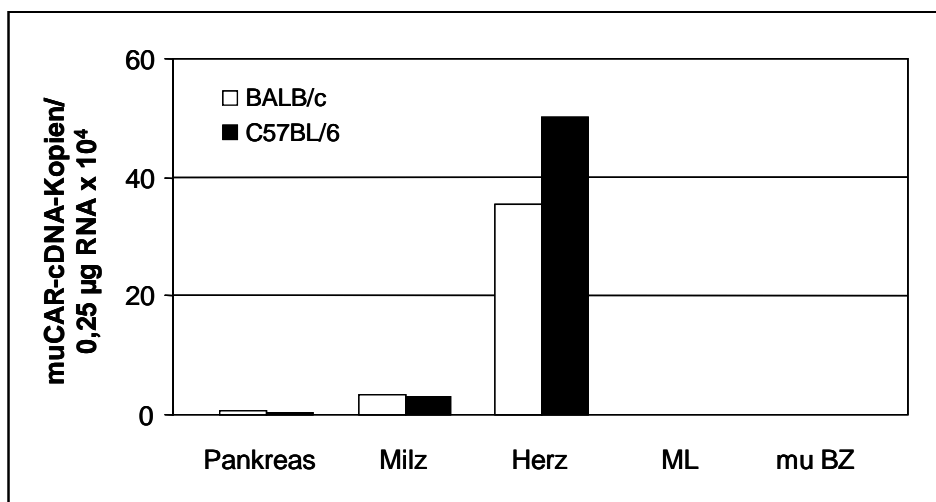


Abb. 10: Untersuchung zur Transkription von *muCAR* in verschiedenen murinen Geweben und Zellen. RNA wurde extrahiert aus Pankreas-, Milz- und Herzgewebe sowie aus primären Milzlymphozyten-Suspensionen [ML] und daraus isolierten CD19⁺ B-Zellen [mu BZ] nicht infizierter Mäuse der Stämme BALB/c und C57BL/6. Nach Reverse Transkription von 5 µg RNA/Probe erfolgte der qualitative und quantitative Nachweis von *muCAR*-cDNA mittels real time-PCR.

Dabei konnte bei beiden Mausstämmen weder für das Milzlymphozytengemisch noch für CD19⁺ B-Zellen eine *CAR*-Transkription nachgewiesen werden, während im Gegensatz dazu in den untersuchten Gewebetypen, und dabei vor allem im Herz, deutlich positive und spezifische Signale für das murine *CAR*-Gen messbar waren.

Die Untersuchung der *CAR*-mRNA-Synthese bei humanen B-Zellen erfolgte ebenfalls über eine für den humanen *CAR* spezifische real time-PCR, wobei auch hier gleiche Mengen an RNA aus humanen CD19⁺ B-Zellen sowie aus noch nicht sortierten mononukleären Zellen des peripheren Bluts eingesetzt wurden. Als *CAR*-positive Kontrolle diente in diesem Fall die humane Zelllinie Raji [383]. Wie Abbildung 11 zeigt, konnten für

Raji-Zellen und humane CD19⁺ B-Lymphozyten in etwa gleiche *CAR*-Transkriptionsraten bestimmt werden, wohingegen das Gemisch peripherer mononukleärer Zellen etwa 10-fach höhere Kopienzahlen für das humane *CAR*-Gen aufwies.

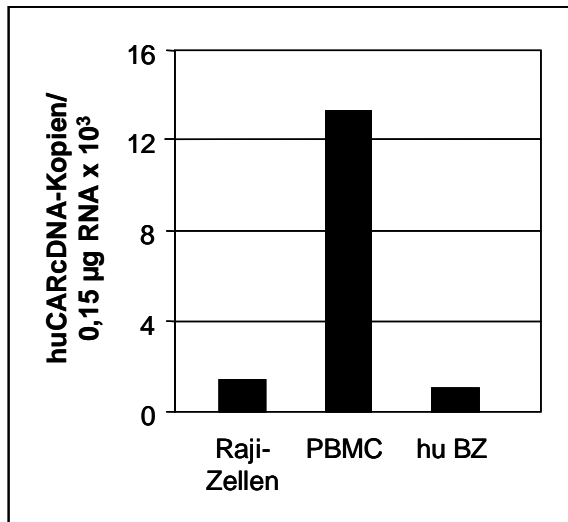


Abb. 11: Untersuchung zur Transkription von *huCAR* in humanen Zellen. Nach Extraktion von RNA aus humanen Raji-Zellen und primären humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes [PBMC] sowie aus humanen CD19⁺ B-Lymphozyten [hu BZ] erfolgte eine Reverse Transkription von 3 µg RNA/Probe. Die Quantifizierung der huCAR-spezifischen cDNA-Kopien wurde mittels real time-PCR durchgeführt.

4.2.1.2 CAR-Translation

Um die Bildung von CAR auf Translationsebene in murinen und humanen CD19⁺ B-Zellen zu untersuchen, wurde nach der Isolierung und Auftrennung des Gesamtproteins aus diesen Zellen ein Antikörper in die nachfolgende Western Blot-Analyse eingesetzt, der aufgrund seiner Kreuzreaktivität sowohl für den Nachweis des murinen als auch des humanen CAR diente. Zusätzlich wurden auch hier die jeweiligen noch nicht magnetisch sortierten Lymphozytengemische aus Milz bzw. humanem peripheren Blut in die Analyse eingeschlossen. Dabei zeigten, wie in Abbildung 12 zu sehen, die als Kontrolle mitgeführten Raji-Zellen ein deutliches CAR-Signal bei 46 kDa. Dagegen war ein CAR-Proteinsynthese-Nachweis sowohl bei murinen Milzlymphozyten als auch bei murinen CD19⁺ B-Zellen, wie aufgrund der Transkriptionsanalyse erwartet, nicht möglich (Abb. 12A). Aber auch bei humanen mononukleären Zellen und CD19⁺ B-Lymphozyten konnte die Bildung von CAR als Protein, trotz der zuvor festgestellten mRNA-Synthese, nicht nachgewiesen werden (Abb. 12B). Eine parallele Analyse der Bildung von zellulärem β -Aktin (45 kDa) diente als Kontrolle der Vergleichbarkeit der eingesetzten Proteinmengen jeder Probe.

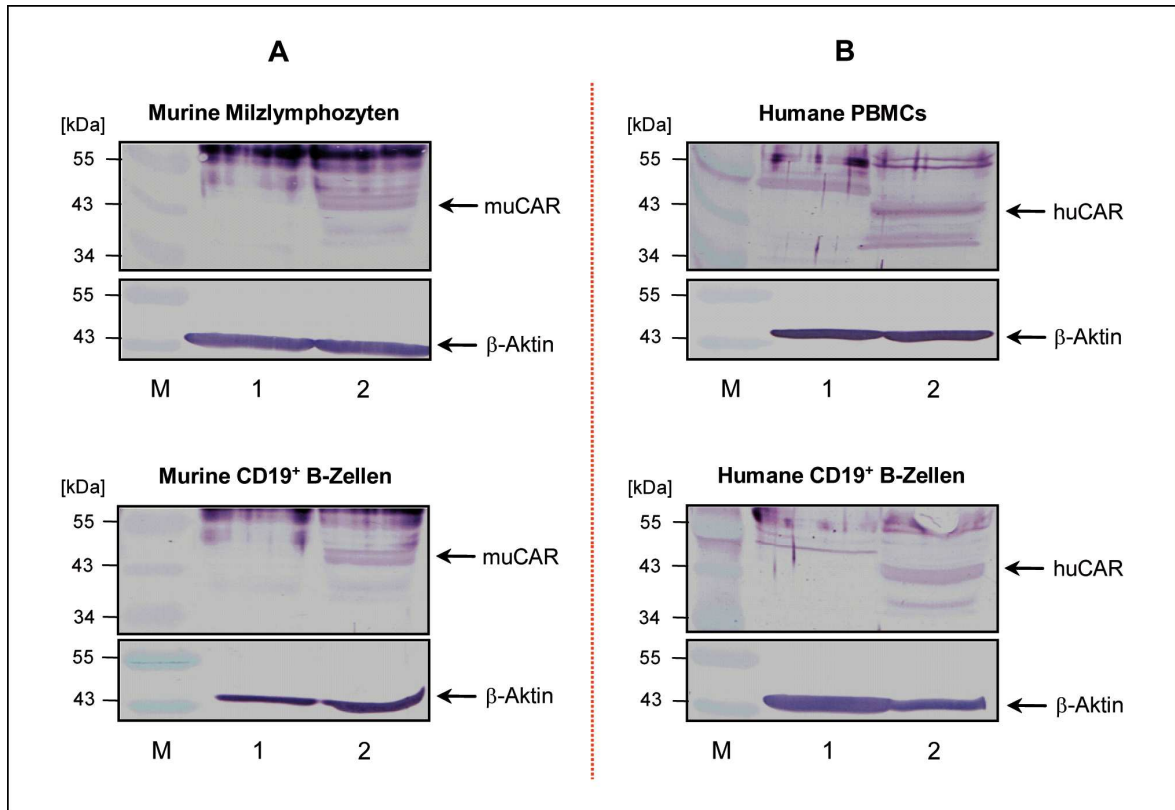


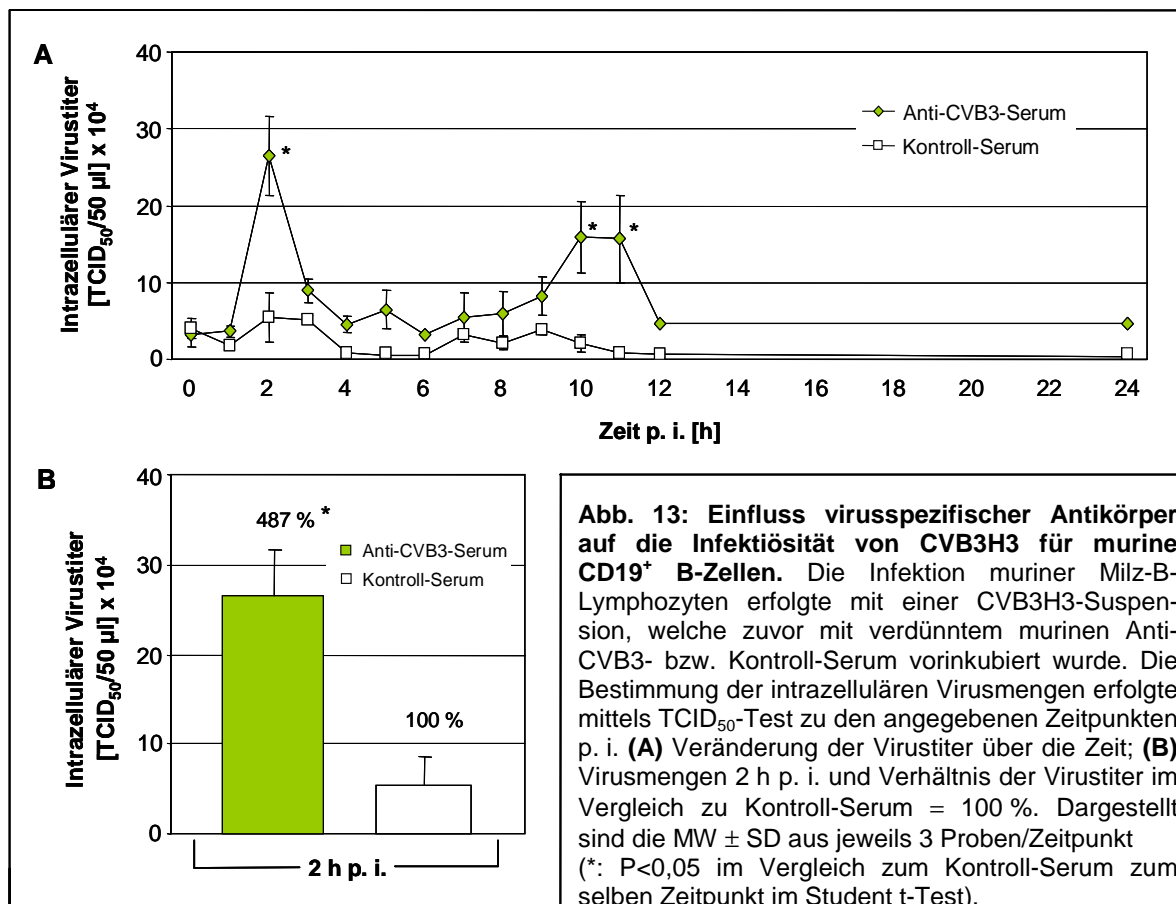
Abb. 12: Nachweis von CAR mittels Western Blot-Analyse. In 10 %-igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennte Proteine aus **(A)** murinen Milzlymphozyten [45 μ g/30 μ g] und daraus isolierten CD19⁺ B-Zellen [45 μ g/30 μ g] sowie aus **(B)** humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) [80 μ g/16 μ g] und daraus extrahierten CD19⁺ B-Lymphozyten [100 μ g/40 μ g] wurden unter Verwendung eines anti-CAR-Antikörpers auf das Vorhandensein von CAR untersucht [aufgetragene Proteinmengen CAR/ β -Aktin]. Als Positivkontrolle dienten, der jeweiligen Probe entsprechende, Proteinmengen aus humanen CAR⁺ Raji-Zellen (spezifische Signale: CAR 46 kDa; β -Aktin 45 kDa; M: Proteinmarker, 1: jeweilige murine bzw. humane Zellpopulation, 2: Raji-Zellen).

4.2.2 Steigerung der CVB3-Infektiösität durch virusspezifisches Serum

Da es nicht möglich war eine Expression von CAR auf der Zelloberfläche muriner und humaner CD19⁺ B-Lymphozyten nachzuweisen und somit eine Internalisierung infektiöser CVB3-Partikel in diese Zellen über CAR unwahrscheinlich ist, sollte im Folgenden eine weitere Möglichkeit der Penetration untersucht werden. Diese über Antikörper vermittelte Strategie des Eindringens und eine daraus resultierende Steigerung der Infektiösität für humane PBMCs konnte 2001 durch Hober et al. und Chehadeh et al. bereits für das heterologe CVB4 gezeigt werden [40, 140].

Um herauszufinden, inwieweit auch Antikörper gegen CVB3 ein solches Eindringen in primäre murine CAR-negative, CD19⁺ B-Lymphozyten der Milz ermöglichen bzw. erleichtern, wurde zunächst ein aus CVB3M2-infizierten Mäusen (7 d p. i.) stammendes Serum gewonnen, welches anschließend mittels Neutralisationstest auf das Vorhandensein CVB3-spezifischer Antikörper getestet wurde. Dabei konnte ein Titer von 1:40 festgestellt

werden. Basierend auf den Experimenten mit CVB4 und in Anlehnung an einen Neutralisationstest wurde dann vor einer CVB3H3-Infektion muriner CD19⁺ Milz-B-Zellen (m.o.i. 10) das Virus mit verdünntem (1:100) Anti-CVB3-Serum bzw. Serum ohne CVB3-Spezifität (Verhältnis 1:1 [v/v]) für 1 h bei 37 °C vorinkubiert und dadurch mit viruspezifischen Antikörpern opsoniert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit diesem Virus-Serum-Gemisch. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die intrazellulären Virustiter bestimmt und somit die Virusaufnahme in die Zellen analysiert (Abb. 13A).



Dabei konnten unter Kontrollbedingungen über das gesamte Intervall nur sehr geringe Veränderungen der Menge infektiöser Partikel beobachtet werden. Wurde CVB3H3 jedoch mit Antikörper-haltigem Serum vorinkubiert, war schon kurz nach Beginn der Infektion (2 h p. i.) eine signifikante ($P < 0,05$), nahezu 5-fache Steigerung der intrazellulären Virustiter im Vergleich zu Kontrollkulturen zu verzeichnen (Abb. 13B). Anschließend fiel die Menge infektiöser Partikel stark ab und erst im späteren Verlauf der Infektion (10-12 h p. i.) konnten nochmals signifikant höhere intrazelluläre Virustiter gegenüber den Kontrollkulturen ermittelt werden. Während der Schlussphase der Infektion waren dann in beiden

Gruppen nur noch geringe Viruspartikelkonzentrationen zu verzeichnen. Dieses Ergebnis konnte nach einer Infektion von murinen CD19⁺ B-Zellen mit Anti-Serum-vorbehandeltem

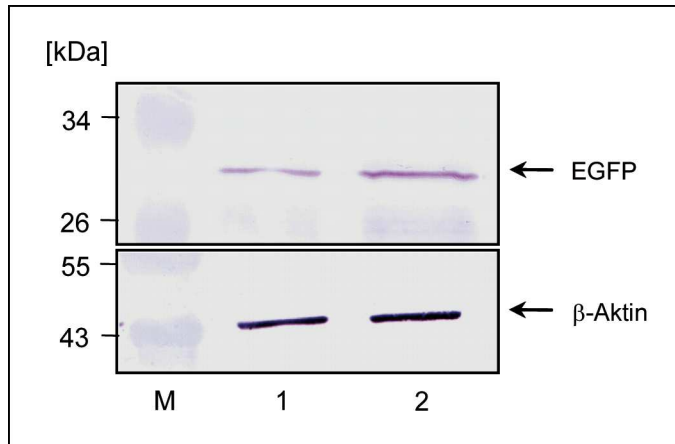
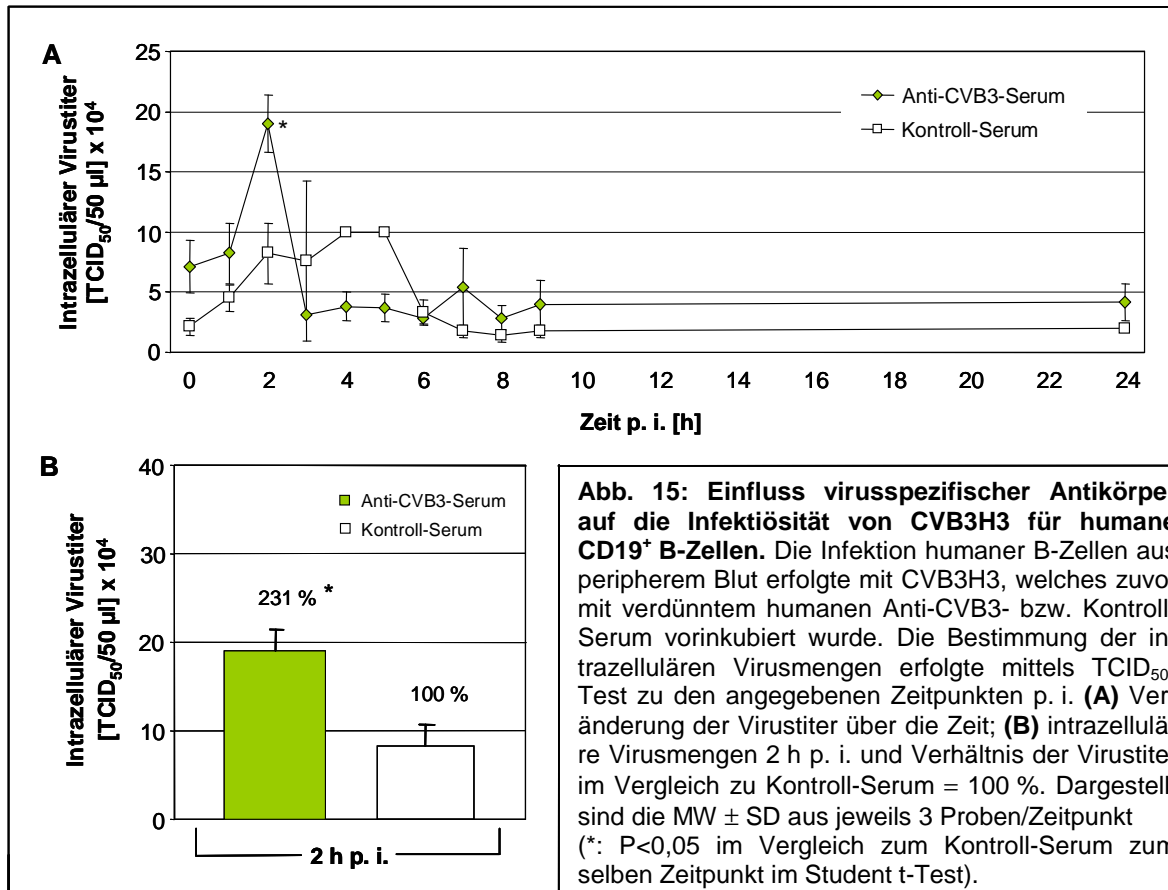


Abb. 14: Nachweis einer durch CVB3-spezifische Antikörper vermittelten Steigerung der Virusmenge in murinen CD19⁺ B-Zellen mittels Western Blot-Analyse. Vor einer Infektion primärer muriner B-Zellen mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) wurde die Virussuspension im Verhältnis 1:1 mit verdünntem (1:100) murinen Anti-CVB3-Serum versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollkulturen erhielten Virus, welches mit Serum ohne virusspezifische Antikörper vorbehandelt wurde. Nach 20 h erfolgte eine Proteinisolierung und die Auftrennung von je 180 µg Protein (EGFP) bzw. 30 µg Protein (β-Aktin) pro Probe in einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel. Bei der anschließenden Western Blot-Analyse wurden spezifische Antikörper zur Detektion von EGFP bzw. β-Aktin eingesetzt (spezifische Signale: EGFP 27 kDa; β-Aktin 43 kDa; M: Proteinmarker, 1: CVB3 + Kontroll-Serum, 2: CVB3 + Anti-CVB3-Serum).

CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 14). Zellen, die mit opsonierten Viruspartikeln infiziert wurden, zeigten dabei 20 h p. i. im Vergleich zu Kontrollkulturen eine deutlich erhöhte Menge an viral gebildetem EGFP.

Entsprechende Untersuchungen mit nahezu gleichem Versuchsaufbau wurden ebenfalls mit primären humanen CAR-negative, CD19⁺ B-Zellen aus peripherem Blut durchgeführt. Die einstündige Vorinkubation von CVB3H3 (m.o.i. 10) erfolgte in diesem Falle mit einem humanen 1:200-verdünntem Serum, welches virusspezifische Anti-

körper (Neutralisationstiter 1:160) enthielt. Das verwendete Kontrollserum wies dagegen keinerlei virusneutralisierende Eigenschaft auf. Wie in Abbildung 15A dargestellt, zeigte sich auch hier 2 h nach der Infektion ein signifikanter ($P < 0,05$), Antikörper-bedingter Anstieg der intrazellulären Virustiter. Im Vergleich zu Kontrollkulturen war die Menge infektiöser Partikel innerhalb der Zellen zu diesem Zeitpunkt mehr als doppelt so hoch (Abb. 15B). B-Zellen mit Kontroll-Serum-behandeltem Virus erreichten dagegen erst 2-3 h später ein Maximum an intrazellulären infektiösen Virionen, welches jedoch immer noch weit unter dem Höchstwert der Vergleichskulturen lag. Zellen dieser, mit opsoniertem Virus inkubierten, Gruppe zeigten im gleichen Zeitintervall (4-5 h p. i.) schon verringerte Erregermengen. Am Ende der Infektionskinetik waren, wie bereits bei murinen CD19⁺ B-Lymphozyten beobachtet, ebenfalls in beiden Gruppen nur noch geringe Viruspartikelkonzentrationen zu verzeichnen.



Eine verstärkte Virusaufnahme in humane, CAR-positive, Raji-Zellen konnte dagegen weder durch die Vorinkubation von CVB3H3 mit dem schon zuvor verwendeten verdünnten (1:200) humanen virusspezifischen Anti-Serum (Abb. 16A) noch durch eine Vorbehandlung der Zellen mit diesem Serum und anschließende CVB3-Infektion erreicht werden (Abb. 16B). In beiden Fällen unterschieden sich die intrazellulären Virustiter über die beobachtete Zeitspanne von 5 h nicht von denen der Kontrollkulturen.

4.2.2.1 Nachweis der Beteiligung virusspezifischer Antikörpern an der gesteigerten CVB3-Infektiosität für murine CD19⁺ B-Zellen

Um die durch die vorangegangenen Versuche bereits vermutete Beteiligung CVB3-spezifischer Antikörper an der gesteigerten Aufnahme von Viruspartikel in murine CD19⁺ B-Lymphozyten zu untersuchen, wurde zunächst der Verdünnungsgrad des verwendeten Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serums verändert. Neben der in allen vorangegangenen und folgenden Experimenten genutzten Menge (1:100) erfolgte die Vorinkubation von CVB3H3 (m.o.i. 10) zusätzlich auch mit stärker verdünntem Serum. In Anlehnung an den zuvor erstellten Infektionsverlauf in CD19⁺ B-Zellen (Abb. 13) wurden 2 h p. i. die intrazellulären Virustiter bestimmt und verglichen.

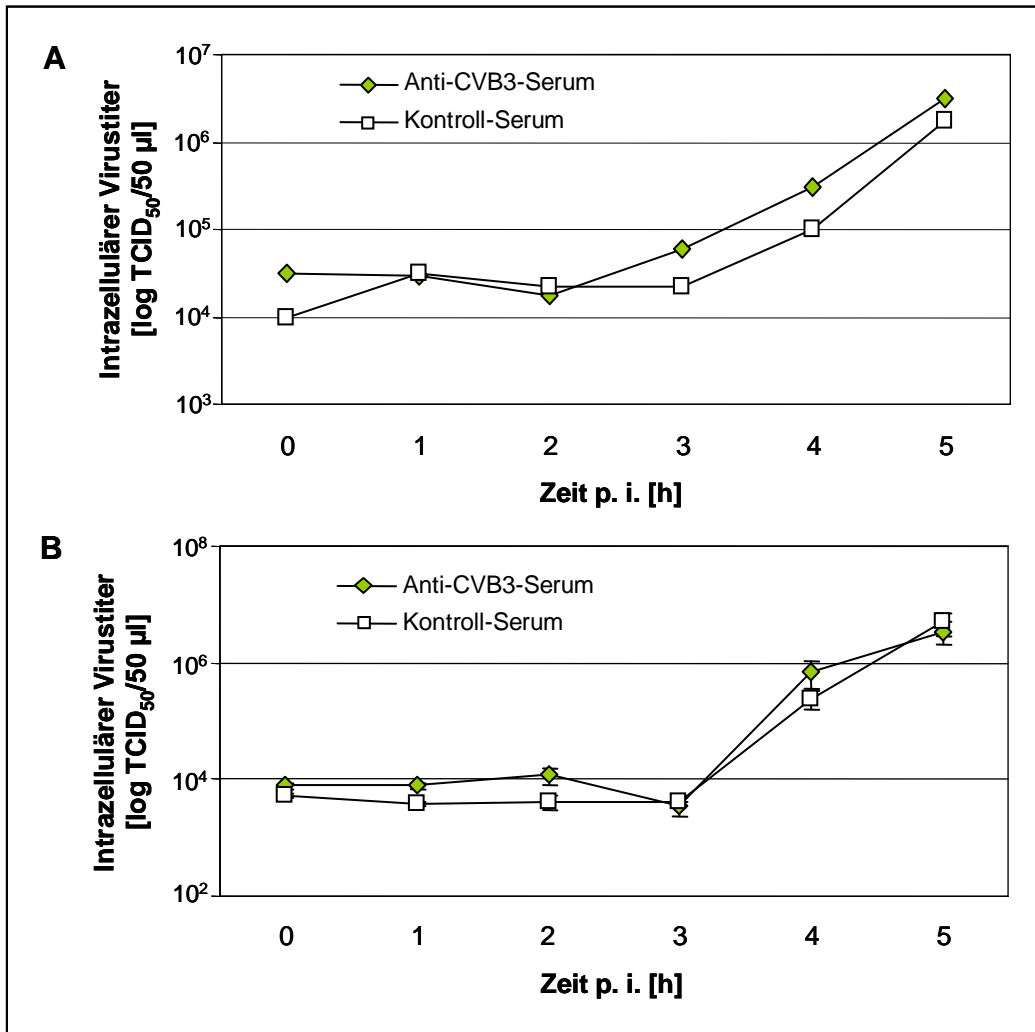


Abb. 16: Einfluss virusspezifischer Antikörper auf die CVB3H3-Infektion humaner Raji-Zellen. Die Zellen wurden mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert, wobei zuvor entweder **(A)** die Virussuspension oder **(B)** das Zellpellet mit verdünntem (1:200) Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum für 1 h bei 37 °C vorinkubiert wurde. Mittels TCID₅₀-Test erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Virustiter zu den angegebenen Zeitpunkten p. i. In **(B)** sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt dargestellt.

Wie Abbildung 17 darstellt, kam es mit zunehmender Verdünnung des murinen Serums und der damit verbundenen Ausdünnung CVB3-spezifischer Antikörper zu einer stetigen Abnahme der intrazellulären Virusmenge. Der bei einer Verdünnung von 1:100 beobachtete Effekt einer gesteigerten Virusaufnahme im Vergleich zu Kontrollkulturen, war bei einer Verdünnung von 1:250 bereits signifikant geringer ($P < 0,05$) und bei 1:500- bzw. 1:1000-verdünntem Serum vollständig aufgehoben ($P < 0,005$). Zellen dieser Kulturen enthielten dabei in etwa gleiche Partikelkonzentrationen wie die Kontrollkulturen. Dagegen hatte die zunehmende Verdünnung des murinen Kontroll-Serums keinen Einfluss auf den intrazellulären Virustiter.

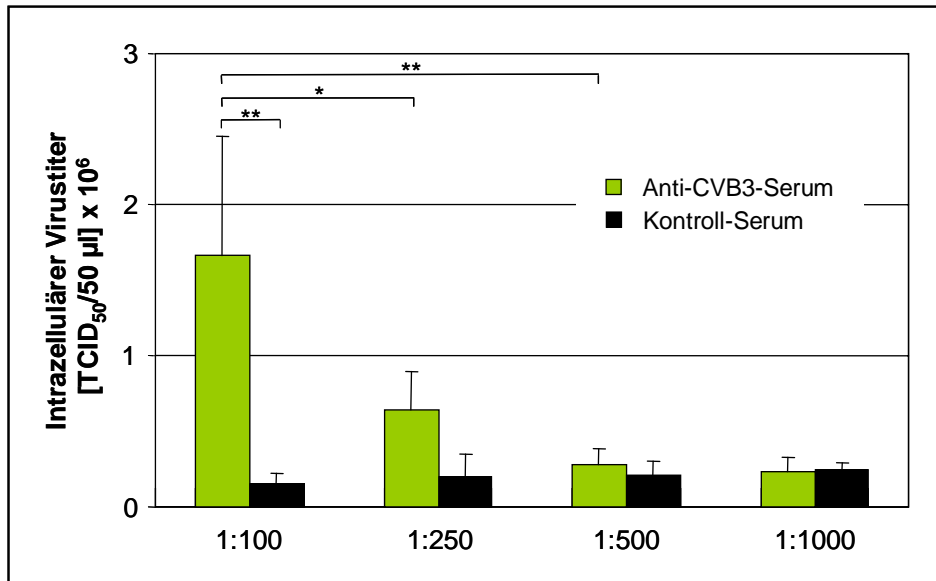


Abb. 17: Abhängigkeit der Infektiosität von CVB3 für murine CD19⁺ B-Lymphozyten vom Verdünnungsgrad des Anti-CVB3-Serums. Murine B-Lymphozyten wurden mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert, welches zuvor mit unterschiedlich stark verdünntem (1:100-1:1000) murinen Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum für 1 h bei 37 °C vorinkubiert wurde. Zwei Stunden p. i. erfolgte die Bestimmung der Viruskonzentrationen im Zellpellet mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Verdünnungsstufe (*: P<0,05 bzw. **: P<0,005 im Vergleich zur jeweils angegebenen Probengruppe [Student t-Test]).

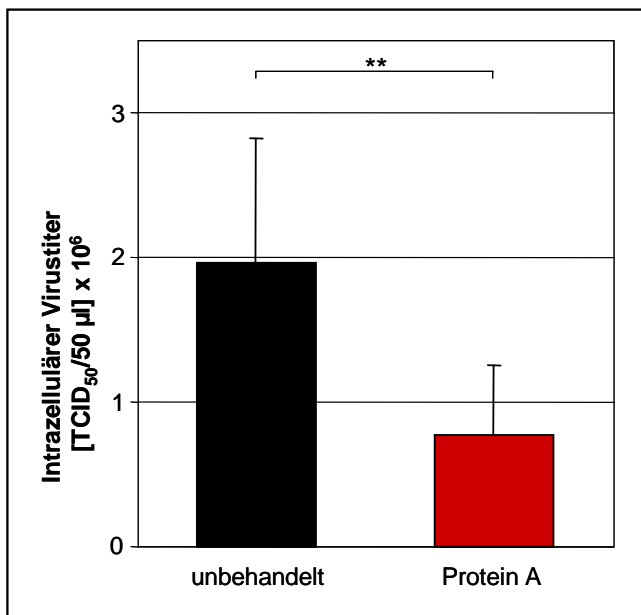


Abb. 18: Einfluss von Protein A auf die durch Anti-CVB3-Serum vermittelte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Lymphozyten. Das zur Infektion muriner B-Zellen verwendete CVB3H3 (m.o.i. 10) wurde mit 1:100-verdünntem Serum vorinkubiert, welches zuvor entweder mit 200 µg/ml Protein A versetzt wurde oder unbehandelt blieb (IKZ: 30 min RT). Die Bestimmung der intrazellulären Virustiter erfolgte 2 h p. i. mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Gruppe (**: P<0,005 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Student t-Test).

Die aufgrund dieser Ergebnisse vermutete Beteiligung von Antikörpern an der Serum-vermittelten Virusaufnahme in CD19⁺ B-Zellen konnte durch die Behandlung des zur Vorinkubation von CVB3H3 (m.o.i. 10) verwendeten Serums mit 200 µg/ml Protein A (30 min bei RT), welches an die Fc-Fragmente von Immunglobulinen bindet, bestätigt werden. Wie Abbildung 18 zeigt, war infolgedessen eine signifikante (P<0,005) Reduktion der in-

trazellulären Virustiter um 61 % im Vergleich zu B-Zellkulturen zu beobachten, deren Viruspartikel vor der Infektion mit unbehandeltem Anti-CVB3-Serum inkubiert worden waren.

4.2.2.2 Neutralisierende Eigenschaft des murinen Anti-CVB3-Serums

Da gesteigerte intrazelluläre CVB3-Mengen ausschließlich durch die Vorinkubation mit Serum erreicht wurden, welches virusspezifische Antikörper enthielt, sollte zusätzlich die neutralisierende Wirkung der verwendeten Serumkonzentration auf CVB3H3 analysiert werden. Dafür wurde die bei allen Untersuchungen eingesetzte konstante Virusmenge von 10 m.o.i. im Verhältnis 1:1 mit verschiedenen Verdünnungsstufen des murinen Anti-CVB3-Serums versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Konzentration noch infektiöser Viruspartikel mittels TCID₅₀-Test (Abb. 19A). Während murines Anti-Serum in den Verdünnungsstufen 1:20 und 1:40 eine deutlich neutralisierende Aktivität zeigte, wurde die eingesetzte Virusmenge nur in geringem Maße durch das unter Versuchsbedingungen eingesetzte 1:100-verdünnte Serum reduziert. Höher verdünntes murines Serum sowie Kontroll-Serum in den Verdünnungen 1:20 und 1:100 verfügten dagegen nicht über eine neutralisierende Wirkung (Abb. 19B).

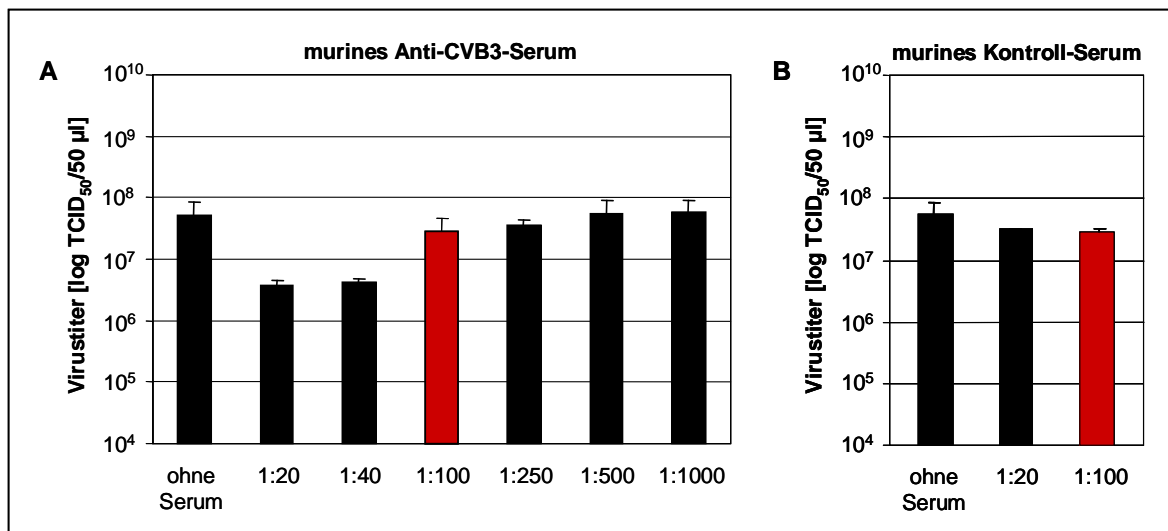


Abb. 19: CVB3-neutralisierende Wirkung verschiedener Verdünnungsstufen des Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serums. Eine Menge an CVB3H3, welche bei einer Zellzahl von 1×10^6 einer m.o.i. 10 entspricht, wurde im Verhältnis 1:1 mit unterschiedlich stark verdünntem murinen **(A)** Anti-CVB3-Serum bzw. **(B)** Kontroll-Serum versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Negativkontrollen wurden mit Zellkulturmedium versetzt [ohne Serum]. Anschließend erfolgte die Titration dieser Suspensionen auf GMK-Zellen mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Verdünnungsstufe.

Inwieweit die verwendete Serumverdünnung von 1:100 trotz der geringen neutralisierenden Eigenschaft in der Lage ist, CVB3-spezifische Antigene zu erkennen, wurde mit Hilfe

der Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode untersucht. Dazu erfolgte in „chamber slides“ (siehe 3.4.16) zunächst eine Infektion von GMK-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 10). Zum Zeitpunkt eines beginnenden ZPE (4 h p. i.) wurden die Zellen gewaschen, fixiert und anschließend für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen des murinen Anti-CVB3-Serums inkubiert. Um die Spezifität der folgenden Immunreaktion für CVB3-spezifische Antikörper nachzuweisen, erhielten Kontrollkulturen entweder das sehr gering verdünnte Serum aus nicht infizierten Mäusen oder blieben unbehandelt. Das Ergebnis der folgenden APAAP-Reaktion ist in Abbildung 20 dargestellt. Wie erwartet, zeigten die Kulturen, die mit einer der beiden neutralisierenden Verdünnungsstufen (1:20 [A]/1:40 [B]) inkubiert worden waren, eine intensive Rotfärbung. In einer Vielzahl der infizierten Zellen war dabei der Zellkern mit einer deutlich helleren Färbung klar erkennbar, was eine virale Replikation im Zytoplasma verdeutlicht. Aber auch das 1:100-verdünnte Serum war trotz geringer neutralisierender Aktivität noch sehr gut in der Lage, CVB3-spezifische Antigene zu detektieren (Abb. 20 [C]). Diese Eigenschaft wurde ab einer Verdünnung von 1:250 [D] deutlich geringer und Kulturen, die 1:1000-verdünntes Serum erhalten [F] hatten unterschieden sich mit einer leicht rosafarbenen Hintergrundfärbung nicht mehr von Kontroll-Serum-behandelten Zellen [G]. Die fehlende Farbreaktion in unbehandelten Zellkulturen [H] bestätigte zusätzlich die Spezifität der durchgeführten APAAP-Methode.

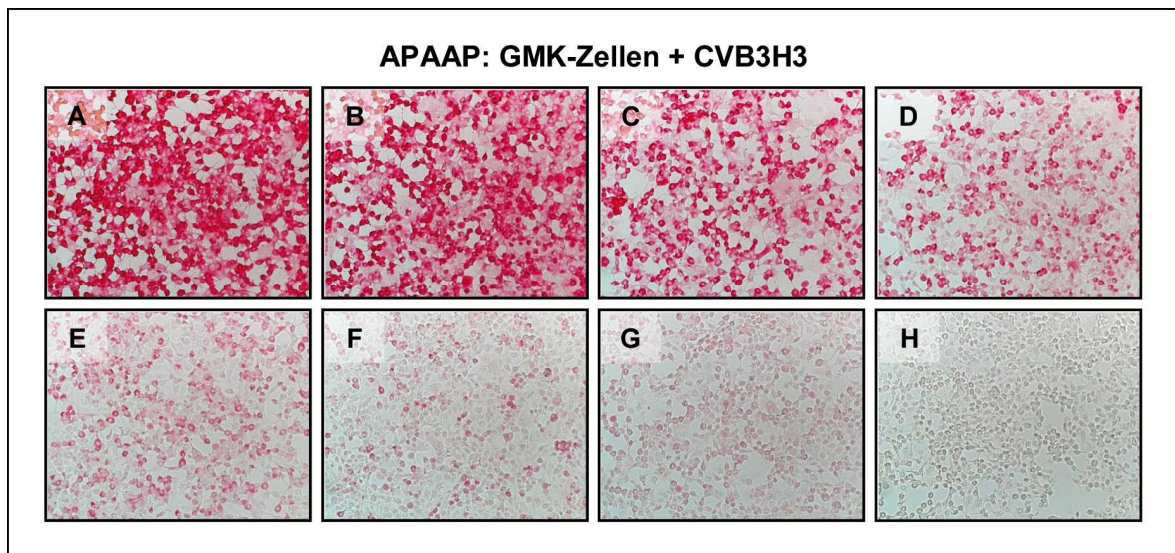


Abb. 20: Detektion viraler Antigene mittels APAAP-Methode unter Verwendung verschiedener Anti-CVB3-Serum-Verdünnungsstufen. GMK-Zellen wurden mit CVB3H3 infiziert. Nach 4 h erfolgte eine Fixierung und anschließend eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit unterschiedlich konzentriertem Anti-CVB3-Serum (**A-F**). Negativkontrollen erhielten entweder 1:20-verdünntes Kontroll-Serum (**G**) oder kein Serum (**H**). Gebundene Antikörper wurden nach mehreren Waschschritten mit Hilfe der APAAP-Reaktion detektiert (Verdünnungsstufen Anti-CVB3-Serum [A-F]: 1:20 [A], 1:40 [B], 1:100 [C], 1:250 [D], 1:500 [E], 1:1000 [F]).

4.2.2.3 Beteiligung zellulärer Fc γ -Rezeptoren an der gesteigerten CVB3-Infektiösität für murine CD19⁺ B-Zellen

Ein bei vielen RNA-Viren, darunter vor allem Flaviviren aber auch CVB4, verbreiteter Mechanismus der Antikörper-abhängigen Steigerung der Infektiösität wird über zelluläre Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) vermittelt. Diese vor allem auf Zellen des Immunsystems lokalisierten Rezeptoren binden dabei Virus-Antikörper-Komplexe und gewährleisten ein effizienteres Eintreten dieser Pathogene in die Wirtszelle [318]. Die Beteiligung des auf B-Lymphozyten exprimierten Fc γ RII (CD32) an der gesteigerten Infektiösität von CVB3H3 für murine B-Zellen wurde zunächst mit Hilfe von entsprechenden Antikörpern für diese Rezeptoren untersucht. Die Blockierung der Fc γ R auf murinen CD19⁺ B-Lymphozyten erfolgte dabei unter Verwendung eines FITC-markierten Antikörpers, der sowohl gegen den murinen Fc γ RII als auch gegen den murinen Fc γ RIII (CD16) gerichtet war. Um die Bindung dieses Immunglobulins an entsprechende Oberflächenmoleküle der verwendeten CD19⁺ B-Lymphozyten unter den geplanten experimentellen Bedingungen nachzuweisen, erfolgte zunächst eine Inkubation (90 min bei 37 °C) nicht infizierter Zellen mit einer vergleichsweise geringen Antikörperkonzentration. Unter Fluoreszenzlicht waren diese Lymphozyten im Gegensatz zu nicht behandelten Kontrollen durch eine deutlich grün leuchtende Zelloberfläche gekennzeichnet (Abb. 21), was zum einen auf ein zahlreiches Vorhandensein von Fc γ R auf CD19⁺ B-Lymphozyten schließen lässt und zum anderen eine gute Bindungseigenschaft des FITC-gekoppelten anti-Fc γ R-Antikörpers für die entsprechenden Epitope widerspiegelte.

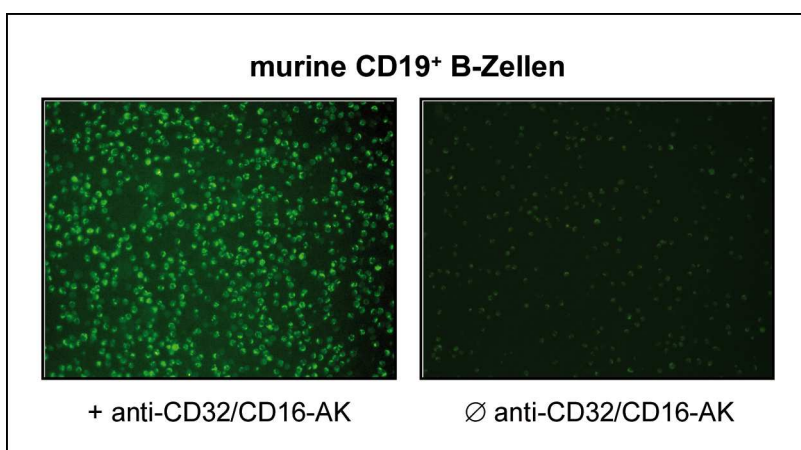


Abb. 21: Nachweis der Bindung CD32/CD16-spezifischer Antikörper an Fc γ R auf murinen CD19⁺ B-Zellen. Primäre murine B-Zellen wurden mit einem FITC-markierten anti CD32/CD16-Antikörper (0,5 μ g/10⁶ Zellen) inkubiert. Kontrollkulturen erhielten keine Antikörpersuspension (Ø). Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Vergrößerung: 400x).

Für die folgenden Untersuchungen zur Beteiligung dieser Fc γ R an der Antikörper-abhängigen Steigerung der Infektiösität wurden Virussuspensionen (m.o.i. 10) wie in den vorangegangenen Experimenten mit 1:100-verdünntem Anti-CVB3-Serum bzw. mit un-

spezifischem Kontroll-Serum vorinkubiert und anschließend zu CD19⁺ B-Lymphozyten gegeben, welche zuvor mit steigenden Konzentrationen von anti-FcγR-Antikörpern behandelt worden waren. Zwei Stunden p. i. war dabei in Kulturen ohne anti-FcγR-Antikörper (0 µg) eine signifikant gesteigerte Aufnahme von opsonierten Viruspartikeln im Vergleich zu Kontroll-Serum-behandelten Virionen ins Zellinnere detektierbar ($P < 0,05$, nicht dargestellt). Wie Abbildung 22 zeigt, konnte dieser Effekt allerdings überraschenderweise nicht durch die Blockierung der zellulären FcγR mit Hilfe des anti-CD32/CD16-Antikörpers abgeschwächt bzw. inhibiert werden. Vielmehr steigerte sich die intrazelluläre Viruskonzentration zu diesem Zeitpunkt mit zunehmender Antikörpermenge zum Teil signifikant ($P < 0,05$) um das 2-4 fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen. Im Gegensatz dazu hatte diese Behandlung keinen Einfluss auf die Aufnahme Kontroll-Serum-inkubierter Viruspartikel.

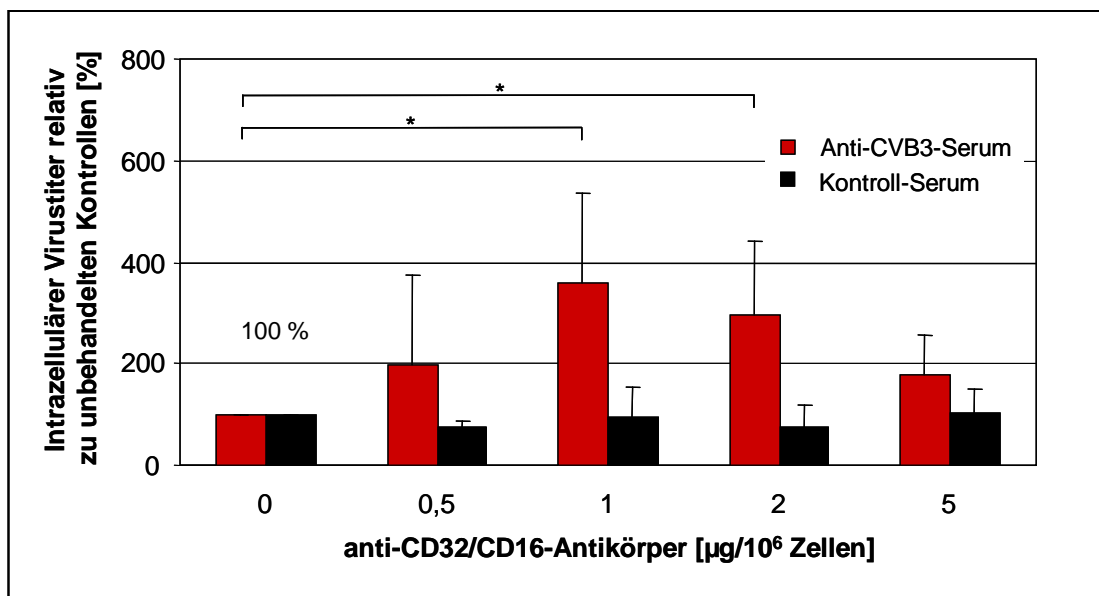


Abb. 22: Einfluss CD32/CD16-spezifischer Antikörper auf die durch Anti-CVB3-Serum vermittelte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Lymphozyten. Nach einer Inkubation (90 min 37 °C) muriner B-Zellen mit einem anti-CD32/CD16-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen wurden diese Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert, welches zuvor im Verhältnis 1:1 mit verdünntem (1:100) murinen Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum vorinkubiert wurde (1 h 37 °C). Kontrollkulturen erhielten vor Infektion keine Antikörpersuspension. Zwei Stunden p. i. erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Virustiter mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die relativen prozentualen MW ± SD aus 3 Proben/Gruppe in Bezug auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle = 100 % (*: $P < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Student t-Test).

Bestätigt wurde diese Beobachtung durch eine Western Blot-Analyse CVB3H3/EGFP-infizierter CD19⁺ B-Zellen (m.o.i. 2,5), die ebenfalls vor der Infektion mit verschiedenen Konzentrationen des anti-FcγR-Antikörpers vorinkubiert worden waren (Abb. 23). Dabei nahm mit steigender Antikörperkonzentration auch die Intensität des EGFP-Signals zu.

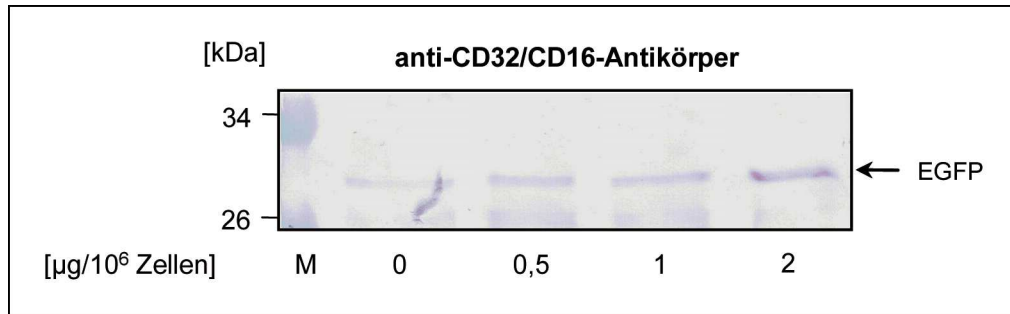


Abb. 23: Untersuchung der Wirkung CD32/CD16-spezifischer Antikörper auf die Anti-CVB3-Antikörper-vermittelte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Zellen mittels Western Blot-Analyse. Die murinen B-Lymphozyten wurden zunächst für 90 min bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen an anti-CD32/CD16-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte eine Infektion mit Anti-CVB3-Serum-vorinkubiertem (1 h 37 °C) CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5). Nach 3 d wurden je 60 µg Protein pro Probe in einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Bei einer folgenden Western Blot-Analyse wurden spezifische monoklonale Antikörper zur Detektion des viral gebildeten EGFP (27 kDa) eingesetzt (M: Proteinmarker).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, erfolgte im oben beschriebenen Versuchsablauf anstelle einer Behandlung der Zellen mit der CD32/CD16-spezifischen Antikörper-Suspension eine Vorinkubation der murinen CD19⁺ B-Lymphozyten mit einem kommerziell erhältlichen FcR-Blockierungsreagenz (Miltenyi Biotec). Dieses üblicherweise während einer MACS sehr seltener Zellpopulationen eingesetzte Gemisch aus verschiedenen murinen Immunglobulinen blockiert effizient alle Fc-Bindestellen auf FcγR-tragenden Zellen. Abbildung 24 stellt die zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollkulturen relativen intrazellulären Virustiter 2 h nach der Infektion mit Serum-vorinkubiertem CVB3H3 dar. Dabei ist, in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten, deutlich zu erkennen, dass auch hier mit zunehmender Konzentration an Blockierungsreagenz Anti-Serum-behandelte Viruspartikel scheinbar effizienter ins Innere der B-Zellen gelangen, während in entsprechenden Kontroll-Serum-Kulturen keine Steigerung der intrazellulären Virusmenge zu verzeichnen war.

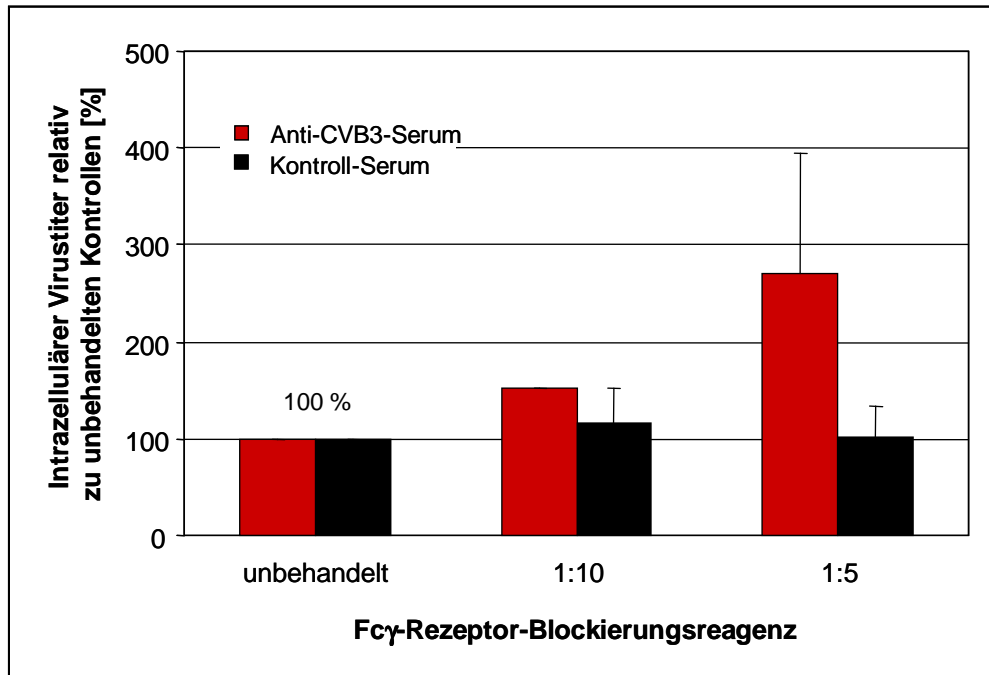


Abb. 24: Wirkung eines FcR-Blockierungsreagenz auf die anti-CVB3-Antikörper-vermittelte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Lymphozyten. Suspensionen muriner B-Zellen wurden im Verhältnis 1:10 bzw. 1:5 mit einem FcR-Blockierungsreagenz inkubiert (10 min bei 4 °C). Kontrollkulturen blieben unbehandelt. Zwei Stunden nach der Infektion dieser Zellen mit Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum-vorinkubiertem (1 h 37 °C) CVB3H3 (m.o.i. 10) erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Virustiter. Dargestellt sind die relativen prozentualen MW \pm SD aus 3 Proben/Gruppe in Bezug auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle = 100 %.

4.2.2.4 Beteiligung des Komplementsystems an der gesteigerten CVB3-Infektiösität für murine CD19⁺ B-Zellen

Da die Untersuchungen zur Blockierung der zellulären FcγR darauf schließen ließen, dass die Antikörper-abhängige Steigerung der CVB3H3-Aufnahme in CD19⁺ B-Zellen nicht oder nur geringfügig über diese Rezeptoren vermittelt wird, sollte im weiteren Verlauf die Beteiligung des Komplementsystems analysiert werden. Dafür wurde zunächst ein klassisches Komplement-Inhibierungsexperiment durchgeführt, bei dem das zur Vorinkubation von CVB3H3 (m.o.i. 10) verwendete verdünnte Serum zunächst für 30 min bei 56 °C erhitzt wurde. Anschließend erfolgte die Infektion primärer muriner CD19⁺ B-Lymphozyten mit dieser Virussuspension. Abbildung 25 zeigt, dass 2 h p. i. die ursprünglich signifikant ($P < 0,005$) gesteigerte Viruskonzentration in B-Zellen, die mit Anti-CVB3-Serum-vorinkubierten Viruspartikeln infiziert wurden, durch ein Erhitzen signifikant ($P < 0,05$) um 45 % reduziert werden konnte. Intrazelluläre Virustiter in Kontroll-Serum-Kulturen blieben dagegen trotz gleicher Behandlung unverändert.

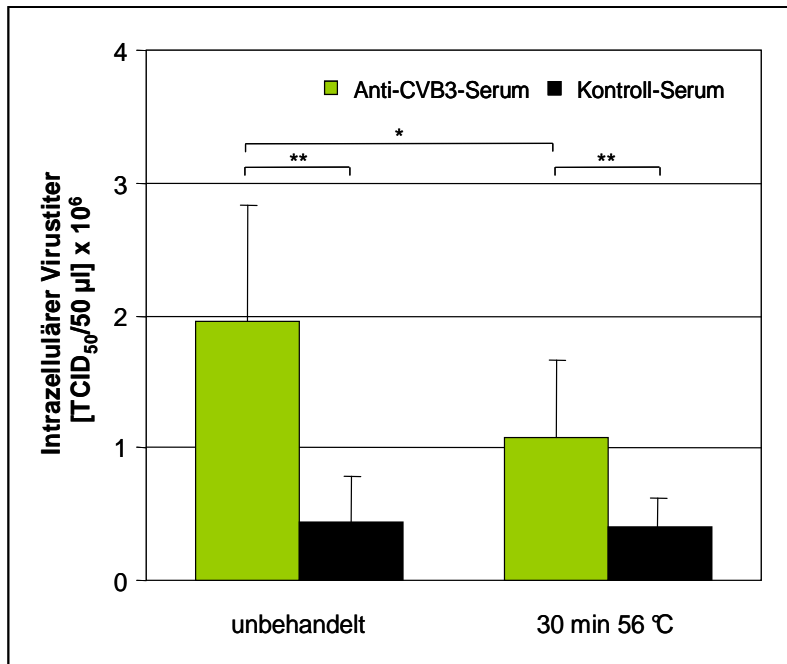


Abb. 25: Effekt einer Hitze-Behandlung von murinem Anti-CVB3-Serum zur Komplementinaktivierung auf die anti-CVB3-Antikörper-vermittelte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Lymphozyten. Das zur Infektion muriner B-Zellen verwendete CVB3H3 (m.o.i. 10) wurde mit 1:100-verdünntem Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum vorinkubiert (1 h 37 °C), welches zu vor einer 30-minütigen Hitze-Inaktivierung bei 56 °C unterzogen wurde oder unbehandelt blieb. Die Bestimmung der intrazellulären Virustiter erfolgte 2 h p. i. mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Gruppe (*: P<0,05 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, **: P<0,005 in Bezug auf entsprechende Kontrolle-Serum-behandelte Kulturen [Student t-Test]).

Um die durch diesen Vorversuch vermutete Beteiligung des Komplementsystems näher zu untersuchen, sollte zunächst analysiert werden, ob und inwieweit eine Komplement-Aktivierung bei der beobachteten gesteigerten Aufnahme opsonierter CVB3-Partikel in CD19⁺ B-Zellen von Bedeutung ist. Eine Differenzierung zwischen dem klassischen und dem alternativen Weg der Komplementinitiation erfolgte dabei durch die Vorbehandlung des verwendeten Serums

mit zwei verschiedenen Chelatoren, die stabile Komplexverbindungen mit Kationen eingehen. Aus mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA; 10 mM) versetztem Serum wurde ionisiertes Kalzium (Ca²⁺) und Magnesium (Mg²⁺) entfernt, was eine Inhibierung beider Komplement-Aktivierungswege zur Folge hatte. Eine Behandlung mit Ethylenglycol-tetraacetat (EGTA; 10 mM) führte dagegen hauptsächlich zur Bindung freier Kalzium-Ionen, was vorrangig zu einer Blockierung des Ca²⁺-abhängigen, klassischen Aktivierungsweges führte. Da die Bindung von anderen Kationen durch EGTA allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, wurden dem mit diesem Chelator versetzten Serum additiv Mg²⁺-Ionen (7 mM) zugesetzt, um die Komplement-Aktivierung über den von diesen Ionen stark abhängigen alternativen Weg zu gewährleisten. Nach einer 30-minütigen Inkubation des verdünnten Serums mit diesen Substanzen bei RT erfolgte die Zugabe von CVB3H3 (m.o.i. 10) und eine Stunde (bei 37 °C) später die Infektion primärer CD19⁺ B-Lymphozyten. Zwei Stunden p. i. wurden die intrazellulären Virustiter bestimmt und verglichen. Dabei war, wie in Abbildung 26 dargestellt, zu erkennen, dass die signifikant

($P < 0,005$) verstärkte Aufnahme anti-CVB3-Antikörper-behandelter Viruspartikel nur sehr leicht durch den Einsatz der beiden Chelatbildner reduziert werden konnte. Mit einer Senkung der intrazellulären Viruskonzentration um 23 % stellte sich die Zugabe von EGTA in Kombination mit Mg^{2+} -Ionen als am wirkungsvollsten dar, was auf eine geringfügige Beteiligung des klassischen Wegs der Komplement-Aktivierung bzw. in diesen eingebundene Komponenten schließen ließe.

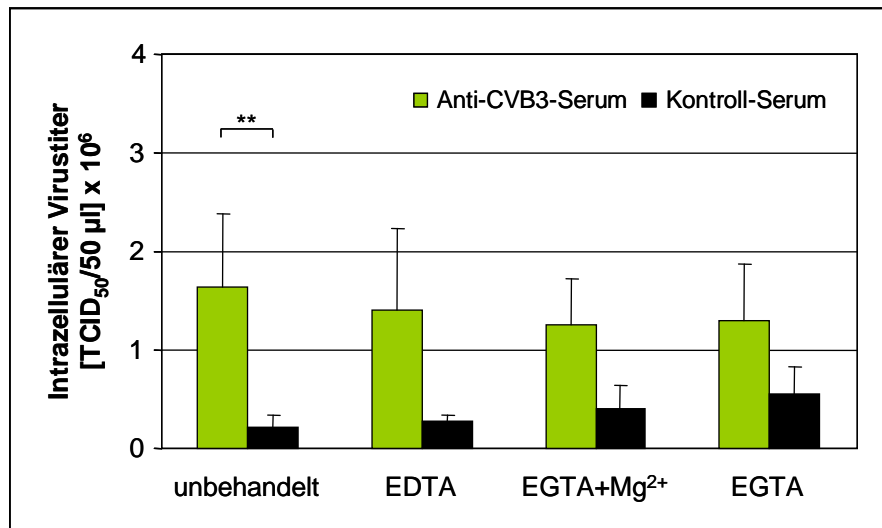


Abb. 26: Wirkung einer Hemmung der Komplementaktivierung im murinen Anti-CVB3-Serum auf den Antikörper-abhängigen Viruseintritt in murine CD19⁺ B-Lymphozyten. Die murinen B-Zellen wurden mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert, welches zuvor mit verdünntem Anti-CVB3- bzw. Kontroll-Serum für 1 h bei 37 °C vorinkubiert wurde. Zusätzlich wurden dabei die verwendeten Seren vor Zugabe zur Virussuspension entweder mit EDTA, EGTA + $MgCl_2$ oder nur mit EGTA versetzt (IKZ: 30 min RT) oder blieben unbehandelt. Die Bestimmung der 2 h p. i. im Zellinneren vorliegenden Virustiter erfolgte mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW \pm SD aus jeweils 3 Proben/Gruppe (**: $P < 0,005$ im Vergleich zum Kontroll-Serum im Student t-Test).

4.3 Untersuchungen zur Infektion CD19⁺ B-Lymphozyten *in vivo*

4.3.1 Verteilung CD19⁺ B-Zellen in CVB3-infizierten Geweben der Maus

Neben der zellulären Immunreaktion, die zumeist über CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ CTL vermittelt wird, stellt auch die humorale Immunantwort des Wirtes einen bedeutenden Zweig des Immunsystems zur Kontrolle und Bekämpfung einer CVB3-Infektion dar. Dabei werden B-Lymphozyten aktiviert, zu infizierten Geweben rekrutiert und zur Bildung virus-spezifischer Antikörper angeregt. Wie Abbildung 27 zeigt, konnten CD19⁺ B-Zellen mit Hilfe einer immunhistochemischen Analyse in verschiedenen Geweben CVB3H3-infizierter BALB/c-Mäuse als bräunlich gefärbte Zellen nachgewiesen werden. Während in nicht infizierten Kontrollmäusen CD19-spezifische Signale nur im follikulären Milzgewebe

sichtbar waren (Abb. 27A), ließen sich nach intraperitonealer (i. p.) CVB3-Injektion bereits 2 d p. i. erste B-Lymphozyten im Pankreas nachweisen. Weitere 5 d später (7 d p. i.) waren dann auch im infizierten Herzgewebe Infiltrate aus CD19⁺ Zellen sichtbar. In der Milz konnte zudem anhand der deutlichen Zunahme positiver Signale eine B-Zellproliferation beobachtet werden (Abb. 27B). Wurde der gegen CD19 gerichtete Antikörper bei Durchführung des immunhistochemischen Verfahrens nicht zugegeben, traten in keinem der infizierten Gewebe positive Signale auf, was die Spezifität dieser Detektionsmethode bestätigte (Abb. 27C). Zusätzlich erfolgte nach einer RNA-Isolierung aus allen Geweben eine CD19-spezifische PCR. Dabei war in allen Organen, die während der immunhistologischen Analyse CD19-positive Signale aufwiesen, auch die Amplifikation eines 410 bp großen PCR-Fragmentes möglich. Im Pankreas- und Herzgewebe nicht infizierter Kontrollmäuse wurde dagegen keine Bande in der entsprechenden Größe detektiert (Abb. 27A/B).

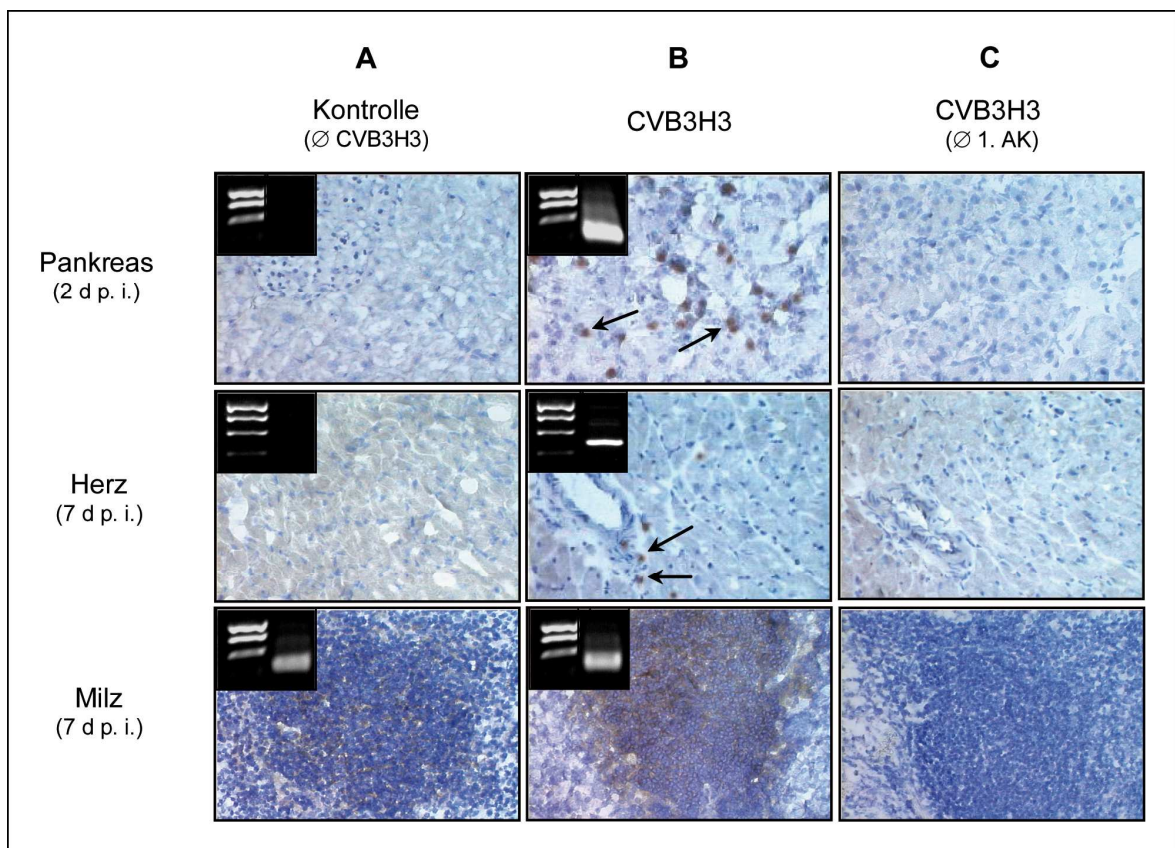


Abb. 27: Detektion muriner CD19⁺ B-Zellen in CVB3-infizierten Geweben. Nach der Infektion männlicher BALB/c-Mäuse mit CVB3H3 erfolgte die Isolation des Pankreasgewebes einiger Tiere 2 d p. i. Herz und Milz wurden hingegen erst 7 d p. i. entnommen. Die aus diesen Proben angefertigten Gefrierschnitte wurden anschließend unter Verwendung eines spezifischen anti-CD19-Antikörpers immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet (Pfeile: bräunlich gefärbte CD19⁺ B-Zellen; Ø 1. AK: Immunhistochemie ohne den ersten Antikörper; Vergrößerung: 200x). Für den Nachweis einer Transkription des *CD19*-Gens in den jeweiligen Geweben wurde nach RNA-Isolation und Reverser Transkription eine CD19-spezifische PCR durchgeführt (spezifisches Amplikon: 410 bp).

4.3.2 CVB3-Infektion muriner CD19⁺ B-Zellen *in vivo*

Wie *In vivo*-Ergebnisse von Mena et al. zeigen, werden nach einer i. p. CVB3-Injektion immunkompetenter C57BL/6-Mäuse B220⁺ B-Zellen infiziert [232]. Während nach 24 h noch keine B-Lymphozyten detektiert werden konnten, die infektiöse Viruspartikel enthielten, war 3 d p. i. eine maximale Anzahl (ca. 1 %) der Zellen infiziert. Weitere 24 h später (4 d p. i.) sank diese Menge auf etwa 0,5 % ab.

Um diese Ergebnisse für das eigene murine Modell bzw. für die daraus isolierten primären CD19⁺ B-Lymphozyten zu bestätigen, wurden zunächst immunkompetente BALB/c-Mäuse i. p. mit CVB3H3 (100 LD₅₀) infiziert. An verschiedenen Tagen (1 d, 3 d, 4 d) p. i. erfolgte die Isolation CD19⁺ B-Zellen aus dem Milzgewebe von jeweils 3 Tieren mittels MACS-Technologie. Nach RNA-Extraktion aus den gewonnenen Zellen, Reverser Transkription und einer sich anschließenden für das Viruskapsid-Protein VP1 spezifischen PCR konnte gezeigt werden, dass in CD19⁺ B-Lymphozyten bereits 24 h nach der Infektion eine geringe Expression viraler Gene stattfand (Abb. 28A). Drei und vier Tage p. i. waren deutliche VP1-Banden sichtbar. Die Amplifikation des zellulären β -Aktins diente zur Kontrolle der RNA-Isolation und cDNA-Synthese.

Zusätzlich konnten mittels strangspezifischer RT-PCR in RNA-Präparationen aus CD19⁺ B-Zellen, die 3 d p. i. isoliert wurden, neben genomischer Plus-Strang-RNA auch virale Negativ-Strang-Intermediate nachgewiesen werden, die eine in diesen Zellen stattfindende aktive Virusvermehrung vermuten ließen (Abb. 28B). Neben dem qualitativen Genom-Nachweis erfolgte auch eine quantitative Analyse der viralen RNA mittels real time-RT-PCR, wobei durchschnittlich $1,5 \times 10^6$ cDNA-Moleküle für Plus-Strang-RNA/0,25 μ g RNA bzw. 7×10^4 cDNA-Moleküle für Minus-Strang-RNA/0,25 μ g RNA detektiert wurden, was einem Verhältnis von 21:1 entspricht.

Diese CVB3-Infektion muriner CD19⁺ B-Zellen konnte durch ICA bestätigt werden, wobei aus den 3 d und 4 d p. i. gewonnenen Lymphozyten verschiedene Verdünnungen mit bekannter Zellzahl hergestellt und auf einen konfluenten GMK-Zellrasen aufgetragen wurden. Nach Immobilisierung der Zellen durch eine Agarschicht und einer IKZ von 3 d wurden die entstandenen Plaques, deren Anzahl der infizierter B-Zellen entsprach, fixiert, gefärbt und ausgezählt. Abbildung 28C zeigt, dass 3 d p. i. nur etwa 0,2-0,3 % der CD19⁺ B-Zellen mit CVBH3 infiziert waren. Einen weiteren Tag später (4 d p. i.) war dieser Prozentsatz dann noch geringer (0,1-0,2 %) und 24 h p. i. konnte mittels ICA keine Infektion CD19⁺ B-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

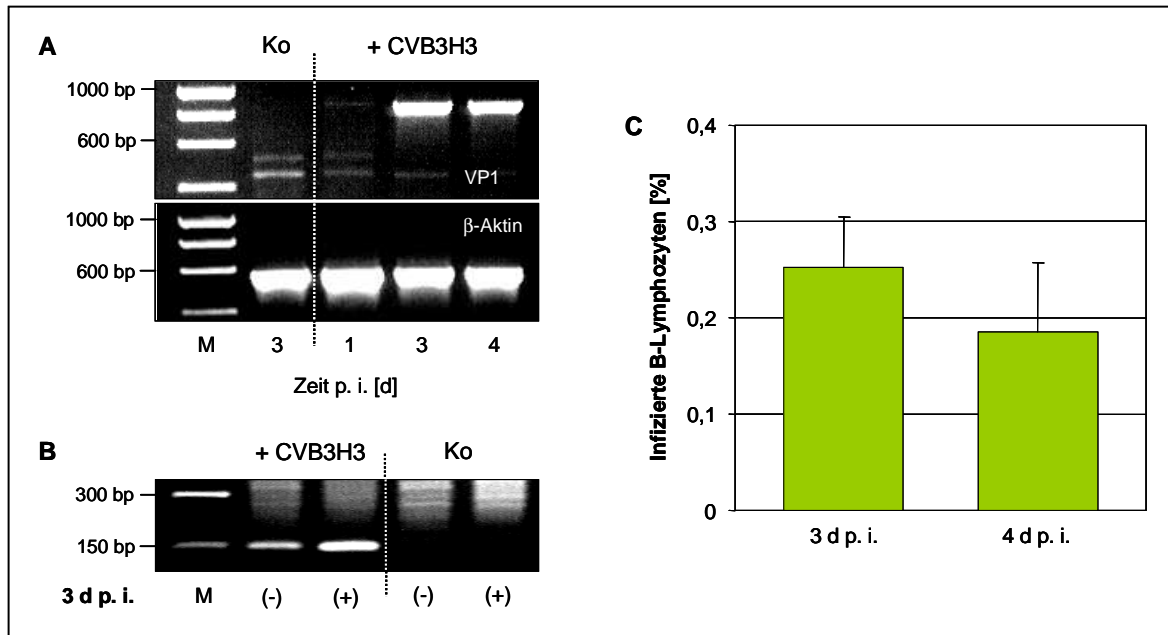


Abb. 28: Untersuchung primärer CD19⁺ B-Lymphozyten aus murinem Milzgewebe nach einer CVB3-Infektion *in vivo*. Männliche BALB/c-Mäuse wurden mit einer Dosis von 100 LD₅₀ CVB3H3 infiziert. Zu den angegebenen Zeiten p. i. wurden Milzzellsuspensionen (aus jeweils 3 Tieren) hergestellt und anschließend erfolgte die Isolation der CD19⁺ B-Lymphozytenpopulation mittels MACS. Aus diesen Zellen wurde RNA extrahiert, danach erfolgte **(A)** der Nachweis viraler Genome nach RT-PCR mit Hilfe einer VP1-spezifischen PCR (spezifisches Amplikon: 851 bp; Kontroll-PCR für murines β -Aktin mit spezifischem Amplikon: 582 bp) und **(B)** der Nachweis von viralen Positiv- und Negativ-RNA-Strängen mittels PCR (Primer: EV1+EV2, spezifisches Amplikon: 145 bp) nach einer strangspezifischen RT-PCR mit je einem der Primer [(-): EV1 für Minus-Stränge bzw. (+): EV2 für Plus-Stränge] ([Ko]: B-Zellen aus nicht infizierten Kontrollmäusen, [+ CVB3]: B-Zellen aus infizierten Mäusen; [M]: DNA-Marker) Ein Teil der isolierten B-Zellen wurde in ICA zur Bestimmung der Anzahl CVB3-infizierter Lymphozyten eingesetzt **(C)**. Dargestellt sind jeweils die MW \pm SD aus jeweils 3 ICA.

Um die Sensitivität eines ICA zu ermitteln, wurden entsprechend den Angaben von Mena et al. (1999) Positivkontroll-Experimente durchgeführt [232]. Dafür erfolgte eine Inkubation von GMK-Zellen mit einer definierten Menge an CVB3H3 (m.o.i. 10), wobei davon ausgegangen wurde, dass bei dieser hohen Partikelzahl jede Zelle infiziert wird. Nach mehrmaligem Waschen des Zellrasens wurden die Zellen abgelöst, verdünnt und ebenfalls auf einen konfluenten GMK-Zellrasen aufgetragen. Das Auszählen der nach 3 d entstandenen Plaques zeigte, dass bei 100 aufgetragenen infizierten Zellen durchschnittlich nur etwa 35 Lysehöfe entstehen, d. h. in etwa dreimal weniger als gemäß der eingesetzten Zellzahl erwartet wurde (Abb. 29). Aufgrund dessen ist der durch den ICA ermittelte Prozentsatz virus-positiver Zellen etwa 3-fach niedriger als der tatsächliche Anteil infizierter CD19⁺ B Lymphozyten an der aufgetragenen Gesamtzellzahl.

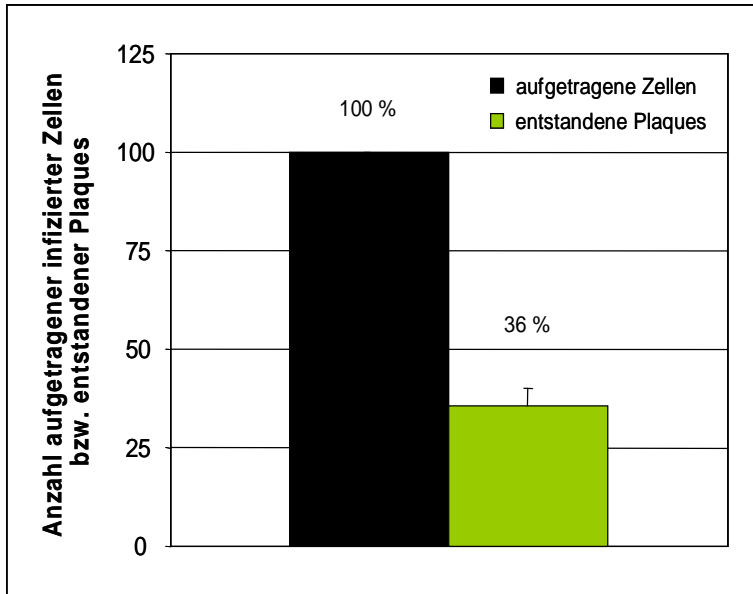


Abb. 29: Untersuchung zur Sensitivität eines ICA. GMK-Zellen wurden mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert. Nach mehrmaligem Waschen und Zählen der Zellen wurden verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt und auf konfluente GMK-Zellrasen aufgetragen. Drei Tage später erfolgte nach einer Färbung der Zellen mit Kristallviolett das Auszählen der Lysehöfe. Dargestellt sind die MW \pm SD der entstandenen Plaqueanzahl aus 3 ICA (grün) bei konstant 100 aufgetragenen infizierter Zellen (schwarz) und zusätzlich das Verhältnis ausgezählter Plaques im Vergleich zur Anzahl eingesetzter Zellen = 100 %.

4.3.3 Einfluss CVB3-spezifischer Antikörper auf *in vivo* infizierte CD19⁺ B-Zellen

Im murinen Modell der CVB3-induzierten Myokarditis konnte gezeigt werden, dass nach einer CV-Primärinfektion von immunkompetenten Mäusen mit dem Serotyp B2 eine nach vier Wochen folgenden Sekundärinfektion mit CVB3 zu deutlich schwerwiegenderen Entzündungen des Herzmuskels führte als bei Tieren, die ausschließlich mit einem der beiden heterologen Viren infiziert wurden [16]. Girn et al. vermuteten später eine, durch die bereits vorhandenen CVB2-spezifischen und mit CVB3 kreuzreagierenden Antikörper vermittelte, Verstärkung der Zweitinfektion als mögliche Ursache für diese Beobachtung [103]. Um zu untersuchen, ob die in den vorangegangenen *In vitro*-Versuchen (vgl. 4.2.2) nachgewiesene gesteigerte Aufnahme Antikörper-konjugierter coxsackieviraler Partikel in murine CD19⁺ B-Lymphozyten der Milz ebenfalls eine Rolle während einer CVB3-Infektion in der Maus spielen könnte, wurde ein *In vivo*-Experiment mit BALB/c-Mäusen, eingeteilt in 5 verschiedene Inokulationsgruppen, durchgeführt (Tab. 7). Während 3 Versuchstiergruppen zuerst unbehandelt blieben, erhielten alle anderen Mäuse zur Induktion virusspezifischer Antikörper eine nicht letale Dosis von 10^6 pfu/0,2 ml des CVB3-Stammes M2 [206]. Zwei Wochen später wurde bei diesen Tieren eine Booster-Infektion in gleicher Weise durchgeführt und nach weiteren 14 Tage erfolgte die Bestimmung CVB3-neutralisierender Antikörper aus arteriellem Blut mittels Neutralisationstest. Dabei wiesen alle Tiere spezifische Immunglobulin-Titer zwischen 1:10 und 1:40 auf. Eine Maus verstarb einen Tag nach der zweiten CVB3M2-Inokulation. Die folgende i. p. Infektion mit dem deutlich virulenteren CVB3H3 [190] (5×10^4 pfu/Tier) erfolgte, wie Tabelle 7 zeigt, nur bei einigen Mäusen, wobei bei einer der Versuchsgruppen die zu inokulierende Virus-suspension in gleicher Weise wie in den vorangegangenen *In vitro*-Experimenten mit mu-

rinem Anti-CVB3-Serum vorinkubiert wurde. Während sich nach einer 3-tägigen IKZ jedes Tier der Gruppen 1, 4 und 5 in einem sehr guten Gesundheitszustand mit Normalgewicht befand, zeigten die einmalig CVB3H3-infizierten Mäuse (Gruppe 2) leichte aber deutliche Krankheitszeichen. Die Inokulation mit opsonierten Viruspartikeln (Gruppe 3) hatte hingegen schwerwiegende äußerliche Symptome wie hohen Gewichtsverlust, Störungen im Bewegungsablauf und struppiges Fell zur Folge, wobei eine Maus noch vor dem geplanten Sektionstermin starb. Allen überlebenden Tieren wurden schließlich 3 d nach der CVB3H3-Infektion Gewebeproben aus Pankreas, Milz und Herz sowie das Blut steril entnommen und für die verschiedenen Untersuchungen und Zellpräparationen vorbereitet.

Tab. 7: Inokulationsschema zur Untersuchung muriner CD19⁺ B-Lymphozyten nach verschiedenen *In vivo*-Infektionen. Fünf Gruppen männlicher BALB/c-Mäuse wurden in verschiedenen Abfolgen mit zwei unterschiedlichen CVB3-Stämmen infiziert. Gruppe 1: nicht infizierte Kontrolle [Ko], Gruppe 2: Infektion mit 5×10^4 pfu CVB3H3 [H3], Gruppe 3: Infektion mit 5×10^4 pfu CVB3H3, welches vor der Injektion mit anti-CVB3-Antikörper-haltigem Mausserum vorinkubiert (1 h 37 °C) wurde [H3 (opsoniert)], Gruppe 4: zwei Infektionen mit je 10^6 pfu CVB3M2 im Abstand von 14 Tagen [M2], Gruppe 5: 2 Infektionen mit je 10^6 pfu CVB3M2 im Abstand von 14 d und weitere 2 Wochen später Sekundärinfektion mit 5×10^4 pfu CVB3H3 [M2+H3] ([+]: Infektion zum angegebenen Zeitpunkt mit dem jeweiligen Virusstamm, [/]: keine Infektion).

| Virus-Stamm: | M2 (1.) | M2 (2.) | H3 | |
|--------------|------------|------------|----|----------------|
| Tag: | 1 | 14 | 24 | |
| | ↓ | ↓ | ↓ | |
| Gruppe | | | | Bezeichnung |
| 1 | / | / | / | Ko |
| 2 | / | / | + | H3 |
| 3 | / | / | + | H3 (opsoniert) |
| 4 | + | + | / | M2 |
| 5 | + | + | + | M2 + H3 |

Die Bestimmung der Viruslast in den einzelnen Organen bzw. im Serum erfolgte mittels TCID₅₀-Test. Dabei konnten bei allen Tieren der Gruppen 1, 4 und 5 weder in den Gewebssuspensionen noch im Serum infektiöse Partikel nachgewiesen werden. Die Virustiter aus Pankreas, Milz und Herz sowie dem Serum aller anderen Tiere sind gruppenweise gemittelt in Abbildung 30 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass im Kontrast zum äußerlich schwerwiegenderen Krankheitszustand der Tiere, welche mit opsoniertem CVB3H3 infiziert wurden, ausschließlich in deren Myokard höhere Viruskonzentrationen vorlagen als

im Herzgewebe von Mäusen der Gruppe 2. In den beiden anderen analysierten Organen und im Serum wiesen dagegen die mit unbehandeltem CVB3H3-infizierten Tiere eine deutlich stärkere Viruslast auf.

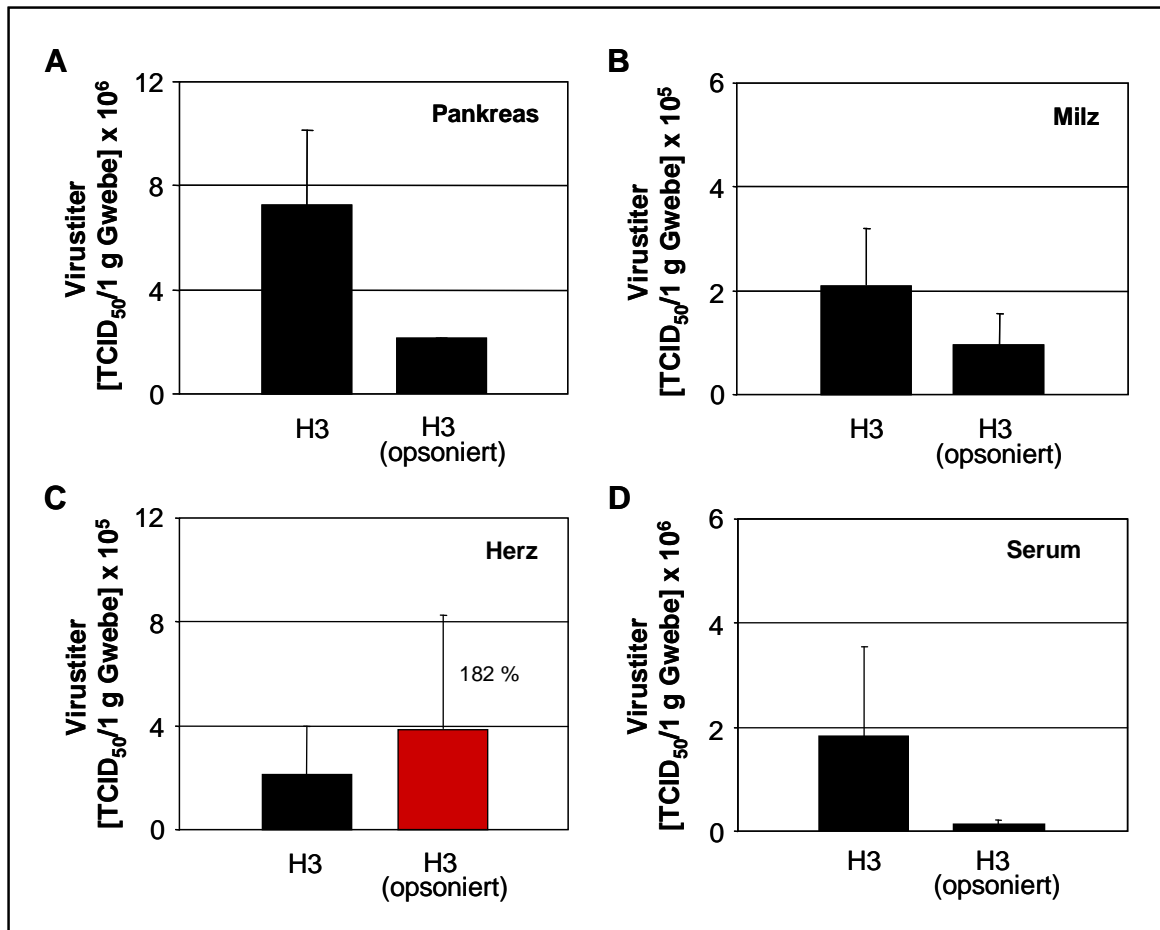


Abb. 30: Viruslast verschiedener Organe und des Serums nach Infektion von BALB/c-Mäusen mit Anti-CVB3-Serum-vorinkubiertem bzw. unbehandeltem CVB3H3. Männliche BALB/c-Mäuse wurden mit 5×10^4 pfu CVB3H3 [H3] infiziert, wobei die Virussuspension für eine der zwei Gruppen vor der Inokulation mit anti-CVB3-Antikörper-haltigem Mausserum vorinkubiert wurde [H3 (opsoniert)]. Drei Tage p. i. wurde allen überlebenden Tieren das Pankreas, Milz- und Herzgewebe sowie das Serum steril entnommen. Die Viruslast wurde mittels TCID₅₀-Test bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD aus 3-4 Tieren/Inokulationsgruppe; in (C) zusätzlich das Verhältnis der Virustiter im Vergleich zur CVB3H3-infizierten Kontrolle = 100 %.

Weiterhin sollte im Zuge dieses Experimentes untersucht werden, ob eine der durchgeführten Infektionsabfolgen, z. B. aufgrund vorliegender CVB3-spezifischer Antikörper im Serum, einen Einfluss auf die Anzahl infizierter B-Lymphozyten bzw. auf die Virusmenge in diesen Zellen hatte. Dazu wurden Milzgewebeproben innerhalb einer Versuchsgruppe gepoolt und zu Einzelzellsuspensionen aufgeschlüsselt. Anschließend erfolgte die Isolierung der CD19⁺ Zellpopulation mittels MACS-Technologie. Während der Prozentsatz infizierter B-Zellen auch hier durch ICA bestimmt wurde, war diese Methode für einen Vergleich intrazellulärer Virus Mengen nicht geeignet, da eine Differenzierung zwischen tat-

sächlich in die Zelle eingedrungenen Viruspartikeln und lediglich an der Oberfläche adsorbierten Virionen nicht möglich war. Zusätzlich erfolgten daher die Isolation von RNA und eine Reverse Transkription aller mRNA-Spezies in cDNA. Für den Nachweis und die Quantifizierung viraler Genome wurden kurze Sequenzen der hochkonservierten 5'-NTR von CVB3 mittels real time-PCR amplifiziert. Wie erwartet, konnten sowohl bei nicht infizierten Kontrollmäusen als auch in allen Tieren der Gruppe 4 keine virus-positiven CD19⁺ B-Lymphozyten detektiert werden. Aber auch bei solchen Tieren, welche aufgrund einer vorangegangenen CVB3M2-Infektion virusspezifische Antikörper gebildet hatten und später zusätzlich mit CVB3H3 infiziert wurden, war ein Nachweis solcher Zellen mit keinem der beiden Analyseverfahren möglich. Ausschließlich in den Gruppen 2 und 3 zeigten etwa 0,4-0,6 % der analysierten B-Zellen eine CVB3-Infektion, wobei allerdings die Vorinkubation der inokulierten Viruspartikel mit Anti-CVB3-Serum keine wesentlichen Veränderung dieses Prozentsatzes zur Folge hatte (Abb. 31A). Und auch die intrazelluläre Virusmenge CD19⁺ B-Zellen unterschied sich in beiden Gruppen nur geringfügig (Abb. 31B).

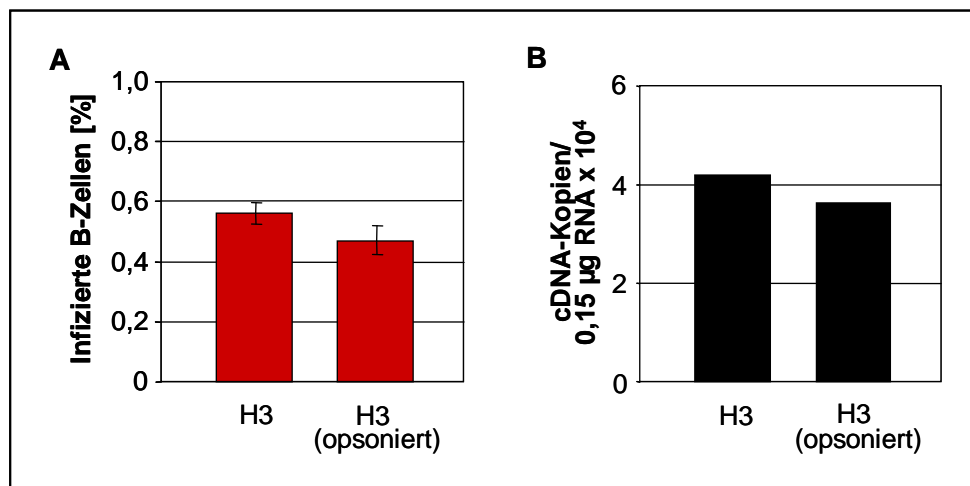


Abb. 31: Untersuchungen zur Infektion primärer CD19⁺ B-Lymphozyten nach Inokulation von BALB/c-Mäusen mit Anti-CVB3-Serum-vorinkubiertem bzw. unbehandeltem CVB3H3. BALB/c-Mäuse wurden mit 5×10^4 pfu CVB3H3 [H3] infiziert, wobei die Virussuspension für eine der zwei Gruppen vor der Inokulation mit anti-CVB3-Antikörper-haltigem Mäuserum vorinkubiert wurde [H3 (opsoniert)]. Drei Tage p. i. wurden Milzgewebsproben jedes Tieres entnommen und gruppenweise gepoolt. Nach der Selektion CD19⁺ B-Zellen über MACS erfolgte **(A)** die Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen mittels ICA sowie **(B)** nach RNA-Isolation gefolgt von Reverser Transkription ein qualitativer und quantitativer Nachweis viraler Gensequenzen mittels real time-PCR. In (A) sind die MW \pm SD aus 3 ICA dargestellt.

Aufgrund der in Abbildung 27 erzielten Ergebnisse wurde vermutet, dass es infolge der vorangegangenen *In vivo*-Infektionen zu einer Proliferation und damit zu einer Aktivierung der B-Lymphozyten im murinen Milzgewebe kam. Da daraus, Studien von Feuer et al. (2002/2004) zufolge [85, 87], ein verändertes Verhalten der Zellen hinsichtlich ihrer Emp-

fänglichkeit für CVB3 resultieren kann, wurden die aus jeder der 5 Versuchsgruppen isolierten CD19⁺ B-Lymphozyten zusätzlich im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Antikörpervermittelt bzw. -unabhängig gesteigerte Mengen an opsonierten CVB3-Partikeln aufzunehmen, analysiert. Dafür erfolgte wie schon in den vorangegangenen *In vitro*-Experimenten eine Infektion der B-Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 10), welches zuvor entweder mit 1:100-verdünntem Anti-Serum (erhitzt [30 min 56 °C bzw. nicht erhitzt] vorinkubiert wurde oder unbehandelt blieb. Die Bestimmung der intrazellulären Viruskonzentrationen erfolgte auch hier 2 h p. i. Aus Abbildung 32 ist zu erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt B-Lymphozyten der Gruppen 1, 4 und 5 signifikant ($P < 0,005$) weniger unbehandelte Virionen aufgenommen hatten als solche aus H3-infizierten Tieren (Gruppen 2 und 3).

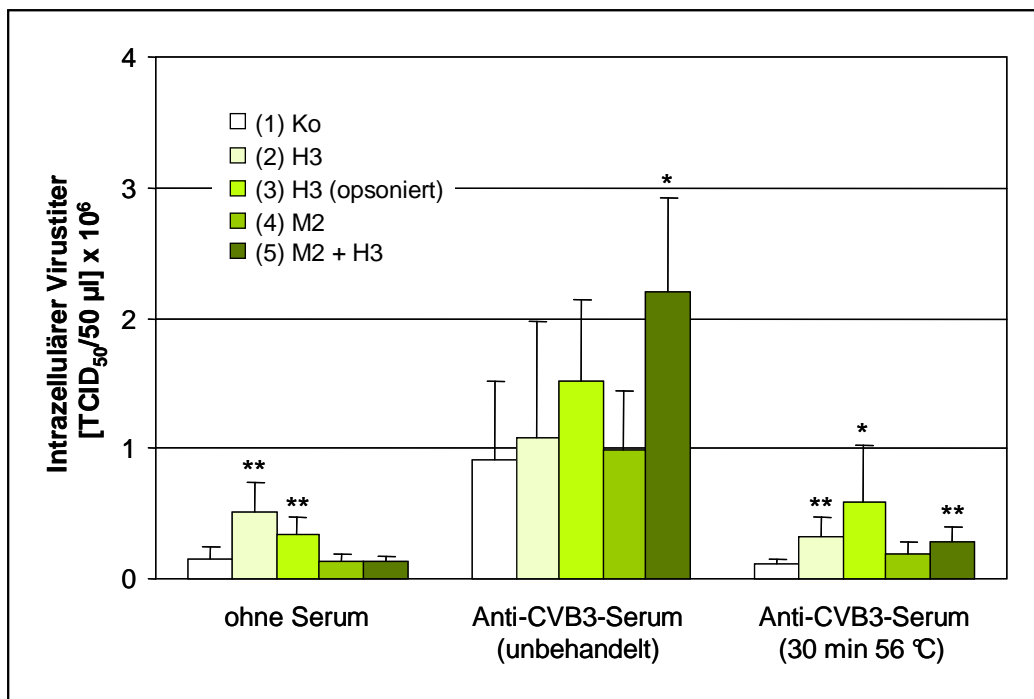


Abb. 32: Einfluss verschiedener *In vivo*-Infektionen auf Aufnahme von CVB3H3 in CD19⁺ B-Lymphozyten *in vitro*. Fünf Gruppen männlicher BALB/c-Mäuse wurden nach unterschiedlichen Inokulationsschemen mit CVB3 infiziert (Gruppe 1: nicht infizierte Kontrolle [Ko], Gruppe 2: Infektion mit 5×10^4 pfu CVB3H3 [H3], Gruppe 3: Infektion mit 5×10^4 pfu CVB3H3, welches vor der Injektion mit anti-CVB3-Antikörper-haltigem Mausserum vorinkubiert (1 h 37 °C) wurde [H3 (opsoniert)], Gruppe 4: zwei Infektionen mit je 10^6 pfu CVB3M2 im Abstand von 14 d [M2], Gruppe 5: zwei Infektionen mit je 10^6 pfu CVB3M2 im Abstand von 14 d und weitere 2 Wochen später Sekundärinfektion mit 5×10^4 pfu CVB3H3 [M2+H3]). Drei Tage nach der CVB3H3-Infektion wurden die mittels MACS aus Milzgewebeproben jeder Gruppe isolierten CD19⁺ B-Zellen *in vitro* mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 10). Dabei erfolgte vor dieser Infektion eine Vorinkubation der Virussuspension entweder mit verdünntem (1:100) unbehandeltem oder erwärmten (56 °C 30 min) Anti-CVB3-Serum. Kontrollzellen aus jeder *In vivo*-Inokulationsgruppe erhielten ausschließlich mit Medium vorinkubiertes Virus [ohne Serum]. Die intrazellulären Virustiter 2 h p. i. wurden mittels TCID₅₀-Test bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SD aus 3 Proben/Gruppe (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,005$ im Vergleich zu B-Zellen aus Kontrollmäusen [Ko] der gleichen *In vitro*-Infektionsgruppe [Student t-Test]).

Wurde die Infektion jedoch mit der Anti-CVB3-Serum-behandelten Virussuspension vorgenommen stiegen die Virustiter der B-Zellen aller Gruppen um ein Vielfaches und in nahezu allen Fällen signifikant an (Tab. 8). Um das 17-fache gesteigert und somit am effektivsten war dabei die Aufnahme opsonierter Partikel in B-Lymphozyten, welche aus Mäusen der Gruppe 5 stammten (M2 + H3). Ein Erhitzen des zur Vorinkubation verwendeten Anti-Serums (30 min bei 56 °C) verhinderte diesen Effekt hingegen vollständig (Abb. 32 und Tab. 8). Dabei waren die gemessenen intrazellulären Titer in etwa so hoch wie die Virusmengen, die nach der Infektion von B-Zellen der gleichen *In vivo*-Infektionsgruppe mit gänzlich unbehandeltem CVB3H3 bestimmt wurden (Tab. 8).

Tab. 8: Einfluss verschiedener *In vivo*-Infektionen auf die Anti-CVB3-Antikörper-vermittelte Aufnahme von CVB3H3 in CD19⁺ B-Lymphozyten *in vitro*. Fünf Gruppen männlicher BALB/c-Mäuse wurden nach unterschiedlichen Inokulationsschemen mit CVB3 infiziert (vgl. Abb. 32). Drei Tage nach der CVB3H3-Infektion wurden die mittels MACS aus Milzgewebsproben jeder Gruppe isolierten CD19⁺ B-Zellen *in vitro* mit CVB3H3 infiziert (m.o.i. 10). Dabei erfolgte vor dieser Infektion eine Vorinkubation der Virussuspension entweder mit verdünntem unbehandeltem [S] oder erwärmten ([S/°C], 56 °C 30 min) Anti-CVB3-Serum. Kontrollzellen aus jeder *In vivo*-Inokulationsgruppe erhielten ausschließlich mit Medium vorinkubiertes Virus [Ø]. Die intrazellulären Viruskonzentrationen wurden 2 h p. i. mittels TCID₅₀-Test bestimmt. In **(A)** ist das Verhältnis der Virustiter aus [S]-Kulturen im Vergleich zu [Ø]-Kontrollen = 100 % dargestellt. **(B)** zeigt die Viruskonzentrationen in [S/°C]- bzw. [Ø]-B-Lymphozyten im Verhältnis zu [S]-Kulturen = 100 % (*: P<0,05, **: P<0,005 im Vergleich zu den jeweiligen Vergleichskulturen im Student t-Test).

| | (A) Anti-Serum-abhängige Steigerung intrazellulärer Virustiter | | (B) Inhibierung der Anti-Serum- abhängigen Steigerung intrazellulärer Virustiter durch Erhitzen | | |
|--------------------|--|-----------|---|---------|------|
| | <i>in vitro</i> (→) | | | | |
| <i>in vivo</i> (↓) | Ø | S | S | S/°C | Ø |
| (1) Ko | 100 % | 621 % * | 100 % | 12 % | 16 % |
| (2) H3 | 100 % | 211 % | 100 % | 31 % * | 47 % |
| (3) H3 (opsoniert) | 100 % | 435 % ** | 100 % | 39 % ** | 23 % |
| (4) M2 | 100 % | 750 % ** | 100 % | 20 % ** | 13 % |
| (5) M2 + H3 | 100 % | 1773 % ** | 100 % | 13 % ** | 6 % |

4.3.4 Stimulation CD19⁺ B-Zellen durch Lipopolysaccharid

Durch eine Stimulation mit bakteriellem LPS ist es möglich, murine B-Zellen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen [310]. Um diesen Effekt für die aus murinen Milzzellsuspensionen stammenden CD19⁺ B-Lymphozyten zu untersuchen, wurden diese für 24 h, 48 h bzw. 72 h in LPS-haltigem (5 µg/ml) oder LPS-freiem Medium kultiviert. Die Bestimmung der Proliferations- bzw. Stoffwechselaktivität der B-Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt erfolgte mit Hilfe eines colorimetrischen Tests, bei dem das farblose Tetrazolium-Salz WST-1 nach Zugabe zum Kulturmedium, einhergehend mit einem Farbumschlag, von vitalen Zellen zu Formazan umgesetzt wurde. Wie Abbildung 33 zeigt, war bei LPS-stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen nach 24 h eine signifikant ($P < 0,001$) höhere Stoffwechselaktivität festzustellen. Zwei und drei Tage nach LPS-Zugabe setzten diese Lymphozyten hingegen nur unwesentlich mehr WST-1 um als entsprechende Kontrollzellen.

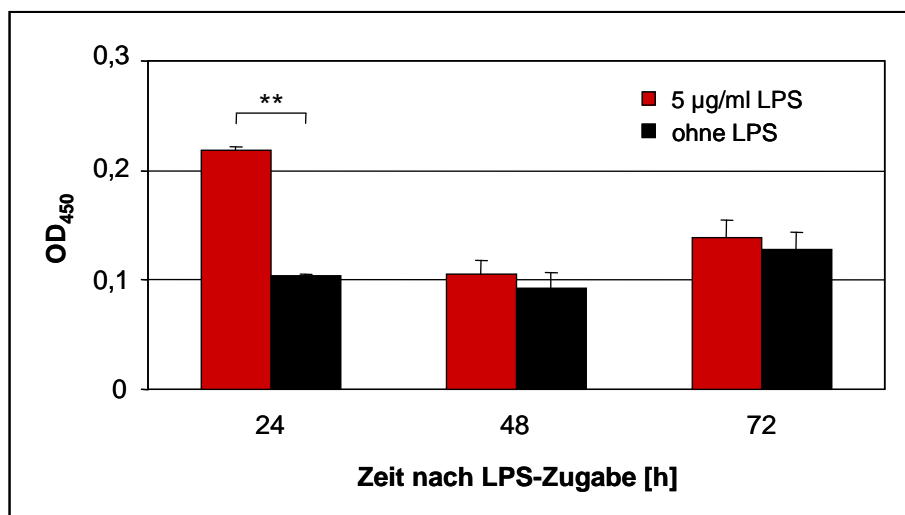


Abb. 33: Untersuchung zur Stimulation muriner CD19⁺ Milz-B-Zellen durch LPS. Primäre murine B-Zellen-Kulturen wurden entweder mit 5 µg/ml LPS versetzt oder blieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach LPS-Zugabe wurde die Stoffwechselaktivität der Kulturen mit Hilfe eines WST-1-Proliferationstests colorimetrisch gemessen. Dargestellt sind die MW ± SD (4 h nach WST-1-Zugabe) aus je 3 Proben/Zeitpunkt (**: $P < 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Student t-Test).

Um herauszufinden, ob die beobachtete LPS-vermittelte Aktivierung bzw. Proliferation einen Einfluss auf den Verlauf einer Virusreplikation in diesen Zellen hat, erfolgte aufgrund des vorangegangenen Experiments vor der Infektion CD19⁺ B-Lymphozyten mit CVB3H3 (m.o.i. 10) eine 24-stündige Stimulation der Zellen mit LPS. Die Lymphozytenanregung wurde dabei unmittelbar und 24 h nach LPS-Zugabe durch einen WST1-Test dokumentiert. Während sich dabei der Aktivitätszustand behandelter Zellen unmittelbar nach

dem Zusetzen von LPS über einen Beobachtungszeitraum von 4 h nicht von dem unbehandelten Kulturen unterschied (Abb. 34A), konnte nach 24 h eine signifikant erhöhte LPS-bedingte Stoffwechselrate über 12 h hinweg festgestellt werden (Abb. 34B).

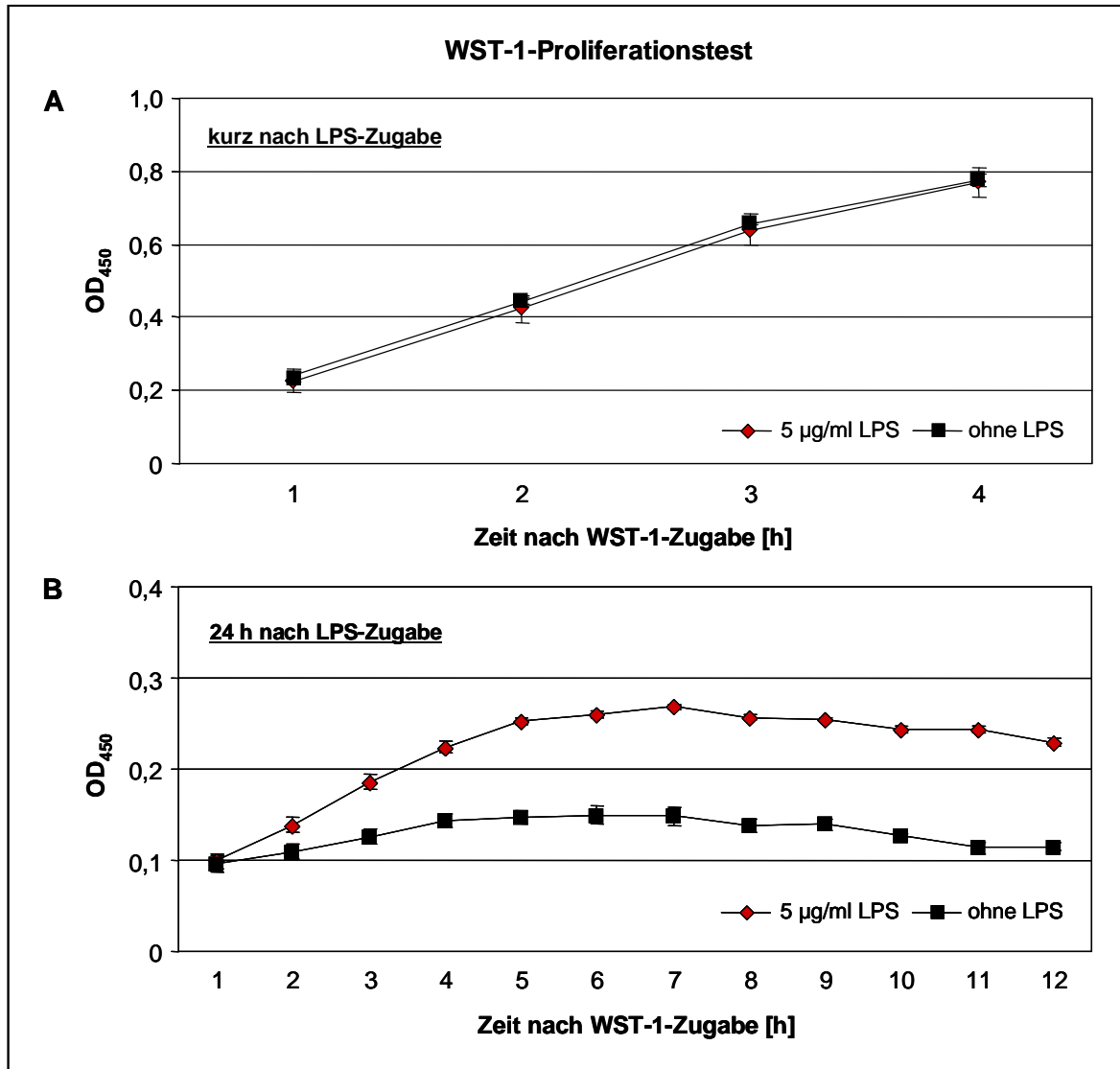


Abb. 34: Stoffwechselaktivität muriner LPS-stimulierter CD19⁺ B-Lymphozyten. Primäre murine B-Zellen-Kulturen wurden entweder mit 5 µg/ml LPS versetzt oder blieben unbehandelt. Unmittelbar nach **(A)** bzw. 24 h nach der Behandlung mit LPS **(B)** wurde die Stoffwechselaktivität der Kulturen mit Hilfe eines WST-1-Proliferationstests colorimetrisch stündlich einmal bis 4 h bzw. bis 12 h nach WST-1-Zugabe gemessen. Dargestellt sind die MW ± SD aus je 3 Proben/Zeitpunkt (in **(B)** alle Werte der LPS-behandelten Kulturen zwischen 2 h-12 h nach WST-1-Zugabe signifikant erhöht, 2 h: P<0,05, 3 h-12 h: P<0,005 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Student t-Test).

Zudem verlief die CVB3-Replikation in diesen stimulierten Lymphozyten anders als in Kontrollkulturen. Abbildung 35 stellt die mittels TCID_{50} -Test bestimmten intrazellulären Viruskonzentrationen über die angegebene Zeitspanne nach der Infektion dar und verdeutlicht, dass die Mengen infektiöser Partikel in LPS-aktivierten Lymphozyten-Kulturen in der frühen Phase des Vermehrungszyklus (2-4 h p. i.) höher waren als in nicht behandelten Proben. Ab 6 h p. i. konnten keine wesentlichen Unterschiede mehr festgestellt werden.

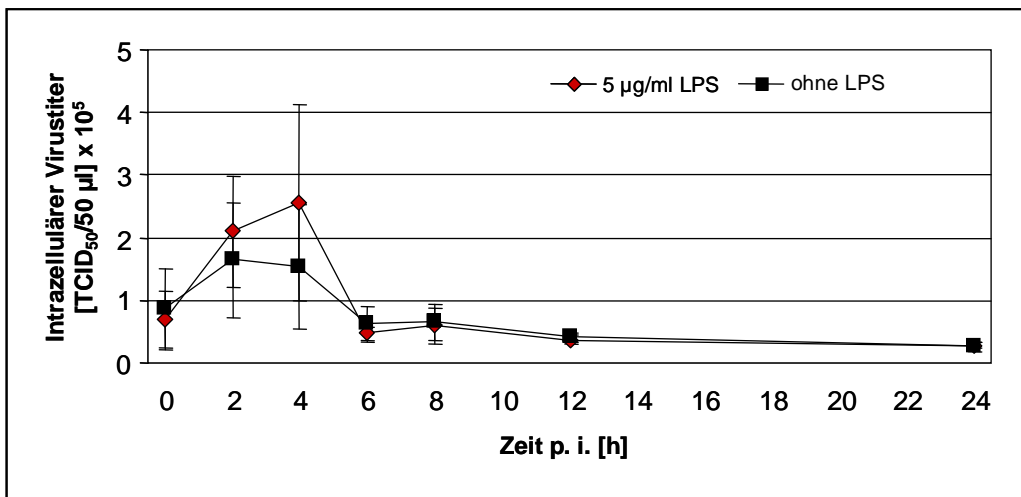


Abb. 35: CVB3-Replikation in LPS-stimulierten murinen CD19^+ B-Lymphozyten. Nach einer 24-stündigen LPS-Stimulation (5 µg/ml) primärer muriner B-Zellen wurden diese mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert. Kontrollkulturen blieben vor der Infektion unbehandelt. Zu den angegebenen Zeiten p. i. erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Viruskonzentrationen. Dargestellt sind die MW \pm SD aus je 3 Proben/Zeitpunkt.

Vergleichende Untersuchungen mit nahezu gleichem Versuchsaufbau wurden ebenfalls mit primären humanen CD19^+ B-Zellen aus peripherem Blut durchgeführt. Auch hier erfolgte die Stimulation der Lymphozyten mit 5 µg/ml LPS, welche sich kurz nach dieser Behandlung im WST-1-Proliferationstest in etwa gleich verhielten (Abb. 36A).

Wie bei murinen B-Zellen, ließ sich zudem 24 h nach LPS-Zugabe eine signifikant gesteigerte Stoffwechselaktivität in stimulierten Kulturen nachweisen (Abb. 36B). Nach dieser Inkubation erfolgte dann die Infektion der Zellen mit CVB3H3 (m.o.i. 10), dessen Replikationskinetik anschließend über 24 h hinweg durch die Bestimmung der intrazellulären Virustiter zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert wurde.

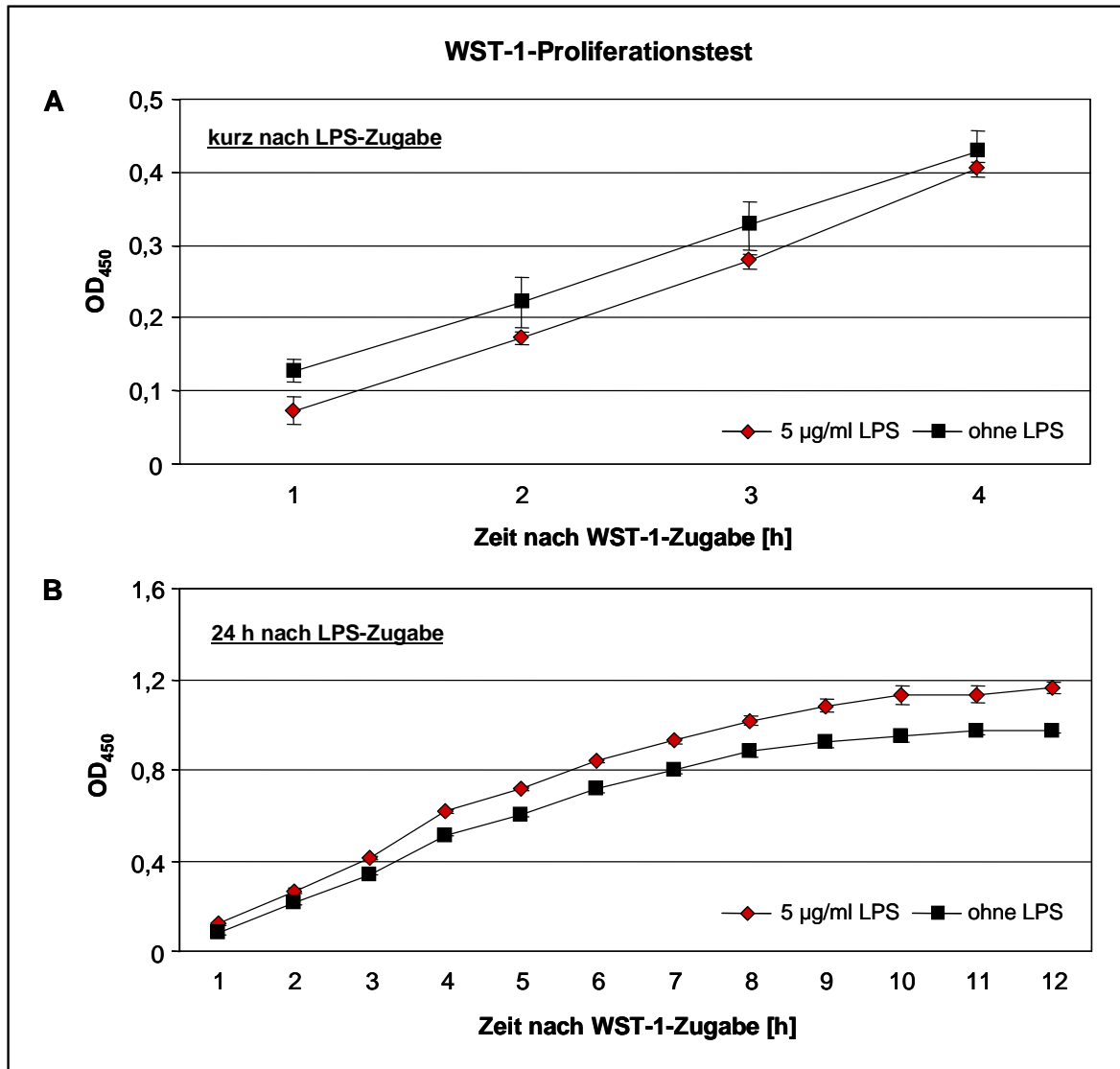


Abb. 36: Stoffwechselaktivität humaner LPS-stimulierter CD19⁺ B-Lymphozyten des peripheren Blutes. Primäre humane B-Zellen-Kulturen wurden entweder mit 5 µg/ml LPS versetzt oder blieben unbehandelt. Kurz nach (A) bzw. 24 h nach der Behandlung mit LPS (B) wurde die Stoffwechselaktivität der Kulturen mit Hilfe eines WST-1-Proliferationstests colorimetrisch stündlich einmal bis 4 h bzw. bis 12 h nach WST-1-Zugabe gemessen. Dargestellt sind die MW ± SD aus je 3 Proben/Zeitpunkt (in (B) alle Werte der LPS-behandelten Kulturen signifikant erhöht $P < 0,005$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Student t-Test).

Aus Abbildung 37 ist zu erkennen, dass ausschließlich in LPS-versetzten Zellkulturen 4 h p. i., d. h. während der frühen Phase der Replikation, ein signifikanter Anstieg ($P < 0,05$) der intrazellulären Viruskonzentrationen zu verzeichnen war. Im weiteren Verlauf konnten dann allerdings, wie schon in murinen CD19⁺ B-Zellen beobachtet, keine wesentlich unterschiedlichen Titer zwischen LPS-behandelten und nicht stimulierten Kulturen mehr festgestellt werden.

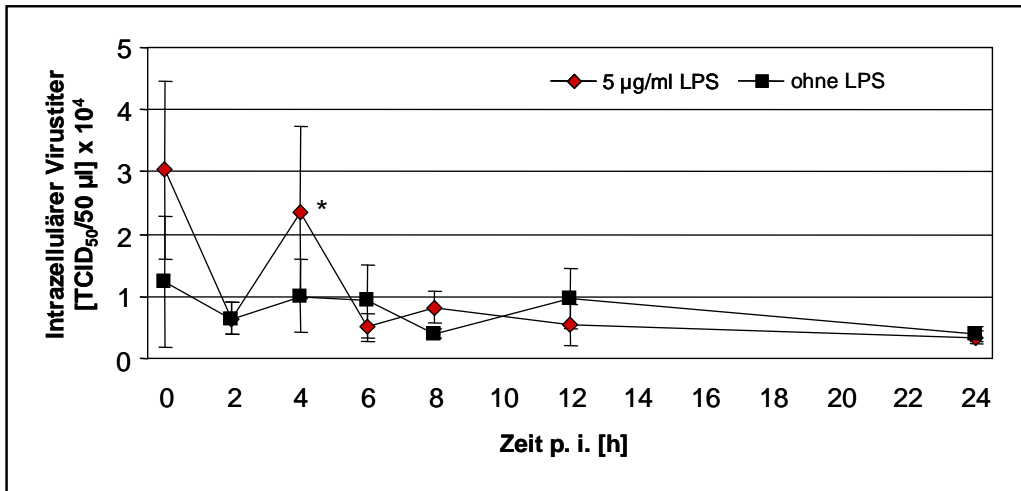


Abb. 37: CVB3-Replikation in LPS-stimulierten humanen CD19⁺ B-Zellen. Nach einer 24-stündigen LPS-Stimulation (5 µg/ml) primärer humaner B-Zellen wurden diese mit CVB3H3 (m.o.i. 10) infiziert. Kontrollkulturen blieben vor der Infektion unbehandelt. Zu den angegebenen Zeiten p. i. erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Viruskonzentrationen. Dargestellt sind die MW ± SD aus je 3 Proben/Zeitpunkt (*: P<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Student t-Test).

4.4 Untersuchungen apoptotischer Prozesse in CVB3-infizierten CD19⁺ B-Lymphozyten

Zahlreiche Studien belegen, dass CVB3 in verschiedenen Geweben und Zelllinien Apoptose induziert und im Zuge dessen zelluläre Caspasen aktiviert werden [30, 31, 39, 54, 219, 304, 379]. Daher sollte untersucht werden, ob und inwieweit auch eine CVB3H3-Infektion muriner oder humaner B-Lymphozyten die Induktion von Apoptose zur Folge hat bzw. ob apoptotische Prozesse die aktive Virusreplikation in diesen Zellen beeinflussen oder überhaupt erst ermöglichen.

4.4.1 Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf die CVB3-Replikation *in vitro*

Um im Verlauf einer CVB3-Infektion von B-Zellen gezielt apoptotische Prozesse zu unterbinden, sollten die zellulären Caspasen, welche die zentralen Mediatoren der Apoptose darstellen, mit Hilfe zweier verschiedener Pan-Caspase-Inhibitoren – Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH – blockiert werden. Einen wesentlichen Unterschied zwischen beiden Inhibitoren stellt die Methylierung des Aspartats im Z-VAD-FMK dar, da diese die negative Ladung der Carboxylgruppe maskiert und somit neben den Caspasen auch die enzymatische Aktivität der coxsackieviralen Proteasen 2A und 3C inhibitorisch beeinflusst [219]. Da zelluläre Esterasen zu einer raschen Demethylierung führen, tritt dieser Effekt allerdings nur transient auf. Q-VD-OPH ist dagegen nicht methyliert und beeinflusst demnach aus-

schließlich die Funktion der zellulären Caspasen, was durch eine Studie von Martin et al. (2007) belegt werden konnte [219].

Der Einfluss beider Verbindungen auf die Replikation von CVB3H3 wurde zunächst für humane Raji-B-Zellen untersucht. Dafür wurden diese Zellen infiziert (m.o.i. 1) und zeitgleich entweder mit Z-VAD-FMK oder mit Q-VD-OPH (je 200 μ M) behandelt. Kontrollkulturen erhielten entsprechend gleiche Mengen an DMSO. Wie in Abbildung 38 dargestellt, erfolgte 0, 3, 5, 7, 11 und 24 h p. i. eine Titerbestimmung mittels TCID₅₀-Test, wobei zusätzlich zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Virusmenge unterschieden wurde. Dabei zeigte sich, dass beide Pan-Caspase-Inhibitoren den Verlauf der CVB3-Infektion in diesen Zellen stark beeinflussten. Bereits 7 h p. i. war die Gesamtvirusmenge im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant reduziert ($P < 0,05$) und verblieb in Anwesenheit von Q-VD-OPH auch im weiteren Verlauf der Infektion bis 24 h p. i. konstant signifikant niedrig ($P < 0,005$). In Z-VAD-FMK-behandelten Kulturen stieg der Virustiter dagegen nach 11 h wieder an (Abb. 38A). Trotzdem war am Versuchsende in beiden Fällen eine starke Reduktion der Gesamtviruskonzentration um 85 % (Q-VD-OPH) bzw. um 56 % (Z-VAD-FMK) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen nachweisbar (Tab. 9). Abbildung 38B/C und Tabelle 9 zeigen zudem, dass die Inaktivierung der zellulären Caspasen einen inhibitorischen Einfluss sowohl auf die intrazelluläre als auch extrazelluläre Virusmenge hatte. Während dabei die Freisetzung reifer Viruspartikel ins umgebende Medium (7-24 h p. i.) durch beide Substanzen sehr stark inhibiert wurde (B), war im Zellinneren eine virale Replikation auch in Inhibitor-behandelten Kulturen nachweisbar (C), obgleich im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich reduzierte Virustiter vorlagen. Dabei zeigte sich zudem zwischen 7 h und 11 h p. i. die, bereits beschriebene, transiente Wirkung von Z-VAD-FMK, da es in diesem Zeitintervall zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Viruskonzentrationen kam und eine Menge an infektiösen Partikeln erreicht wurde, die mit der Q-VD-OPH-behandelten Kulturen 11 h p. i. vergleichbar war.

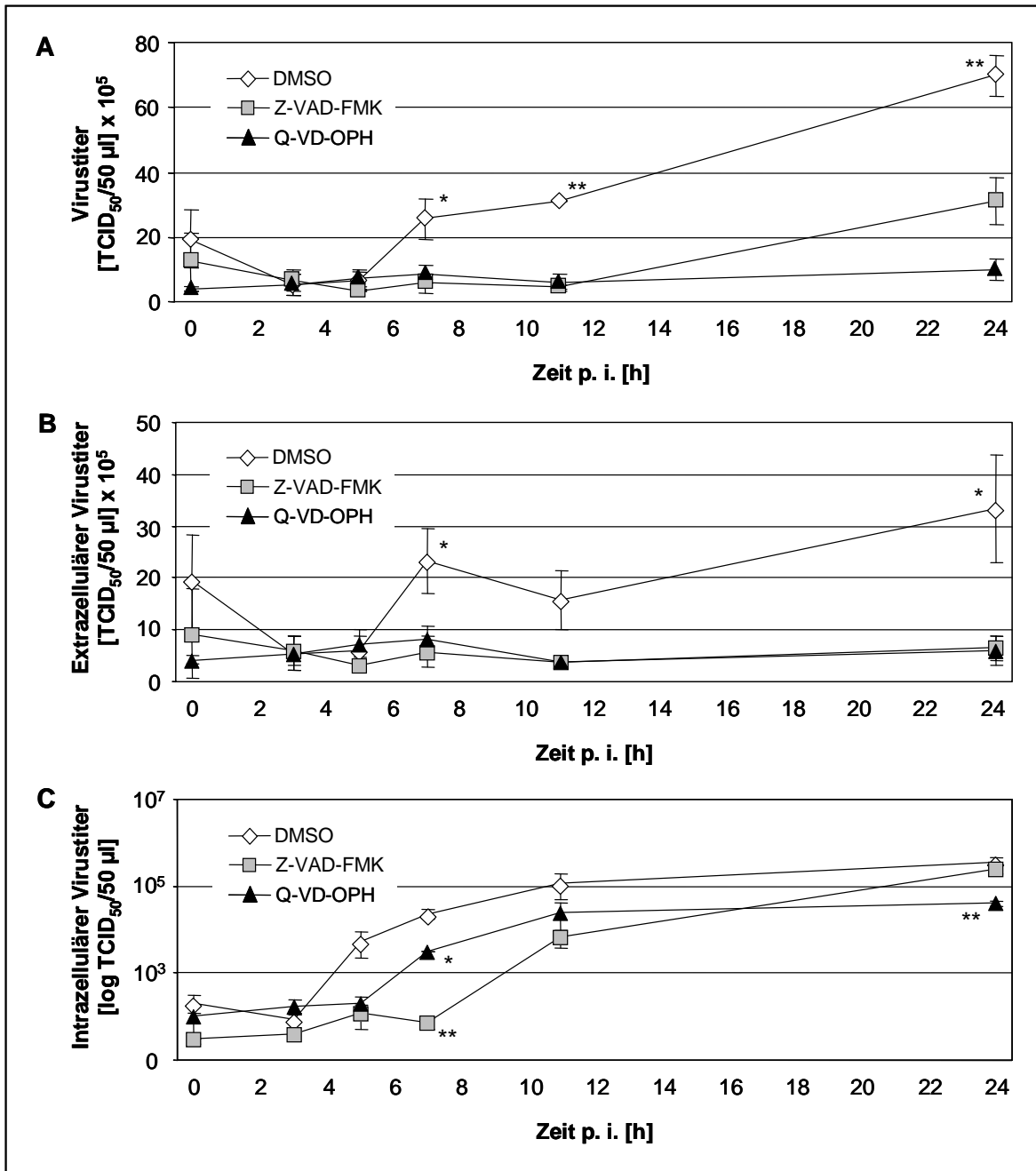


Abb. 38: Nachweis einer Hemmung der CVB3H3-Replikation in humanen Raji-Zellen durch die Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren. Zeitgleich mit der CVB3H3-Infektion (m.o.i. 1) wurden Raji-Zellkulturen entweder mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH (je 200 µM) bzw. DMSO als Kontrolle versetzt. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels TCID₅₀-Test zu den angegebenen Zeitpunkten im Überstand (extrazellulär **[B]**) und im resuspendierten Zellpellet (intrazellulär **[C]**). Gesamtvirustiter **[A]** ergaben sich aus der Addition der intrazellulären und extrazellulären Viruspartikelkonzentrationen. Dargestellt sind die MW ± SD aus 3 Proben/Zeitpunkt (*: P<0,05, **: P<0,005 im Vergleich zu Z-VAD-FMK- bzw. Q-VD-OPH-behandelten Kulturen oder in [C] im Vergleich zur DMSO-Kontrolle im Student t-Test).

Tab. 9: Einfluss von Pan-Caspase-Inhibitoren auf die CVB3-Replikation in humanen Raji-Zellen. Dargestellt ist das Verhältnis der zu den angegebenen Zeitpunkten intra- bzw. extrazellulären Viruskonzentrationen sowie der Gesamtvirustiter Inhibitor-behandelter infizierter Raji-Kulturen im Vergleich zu DMSO-Kontrollen = 100 %. (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,005$ im Vergleich zu DMSO-Kulturen im Student t-Test; [Z]: + Z-VAD-FMK, [Q]: + Q-VD-OPH)

| Raji-Zellen | | 7 h p. i. | | 11 h p. i. | | 24 h p. i. | |
|--------------------|--------------|------------------|---------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| Virustiter | DMSO | Z | Q | Z | Q | Z | Q |
| extrazellulär | 100 % | 25 % * | 35 % * | 24 % | 24 % | 19 % * | 18 % * |
| intrazellulär | 100 % | 0,3 % ** | 13 % * | 5,5 % | 20 % | 68 % | 11 % ** |
| total | 100 % | 23 % * | 33 % * | 14 % ** | 20 % ** | 45 % ** | 14 % ** |

Um zu analysieren, ob auch die Virusreplikation in primären murinen bzw. humanen CD19⁺ B-Lymphozyten mit apoptotischen Prozessen assoziiert ist, erfolgte auch hier zum Zeitpunkt der CVB3H3-Infektion (m.o.i. 5) die Zugabe von 200 μ M Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH bzw. DMSO. Für die Analyse der Inhibitor-Wirkung auf den viralen Replikationsverlauf wurden die Virustiter zu den angegebenen Zeiten p. i. mittels TCID₅₀-Test ermittelt. Da bei der Probennahme eine Trennung von Zellpellet und Kulturüberstand stattfand, war auch hier eine Unterscheidung zwischen der Menge intrazellulärer Viruspartikel und der extrazellulär vorliegenden Viruskonzentration möglich.

Wie schon in Raji-Zellen beobachtet, wurde die Virusreplikation auch in murinen CD19⁺ Milz-B-Zellen stark durch beide Caspase-Inhibitoren beeinträchtigt. Während in Kontrollkulturen schon nach 2 h ein Anstieg der Gesamtvirusmenge mit einem Höchstwert bei 6 h p. i. zu verzeichnen war, inhibierten sowohl Z-VAD-FMK als auch Q-VD-OPH die coxsackievirale Replikation bis 24 h p. i. deutlich (Abb. 39A). Die in DMSO-Kontrollen vorliegenden maximalen Gesamtviruskonzentrationen (6 h p. i.) waren dabei zum gleichen Zeitpunkt in Inhibitor-behandelten Kulturen signifikant ($P < 0,05$) um 73 % bzw. 69 % reduziert (Abb. 39B). Abbildung 40, welche ausschließlich die intrazellulären Virus Mengen darstellt, zeigt jedoch Unterschiede in der Wirkung beider Caspase-Inhibitoren. Nach Zugabe von Q-VD-OPH war die virale Replikation über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu vollständig unterdrückt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Z-VAD-FMK-behandelten Kulturen erst 6 h p. i. eine Reduktion der intrazellulären Virustiter. In der späten Phase des Replikationszyklus (18 h p. i.) konnten demgegenüber in Inhibitor-versetzten Zellsuspensionen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht erhöhte intrazelluläre Viruskonzentrationen festgestellt werden.

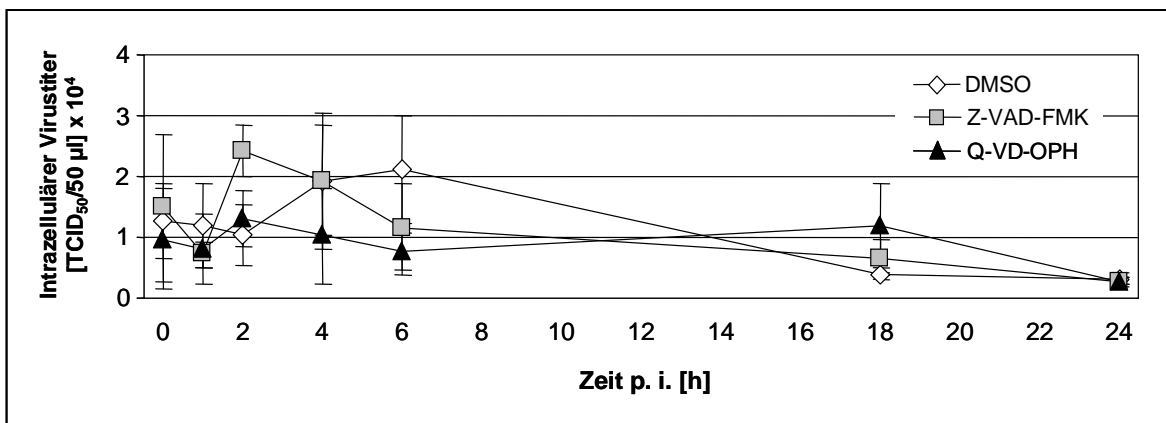
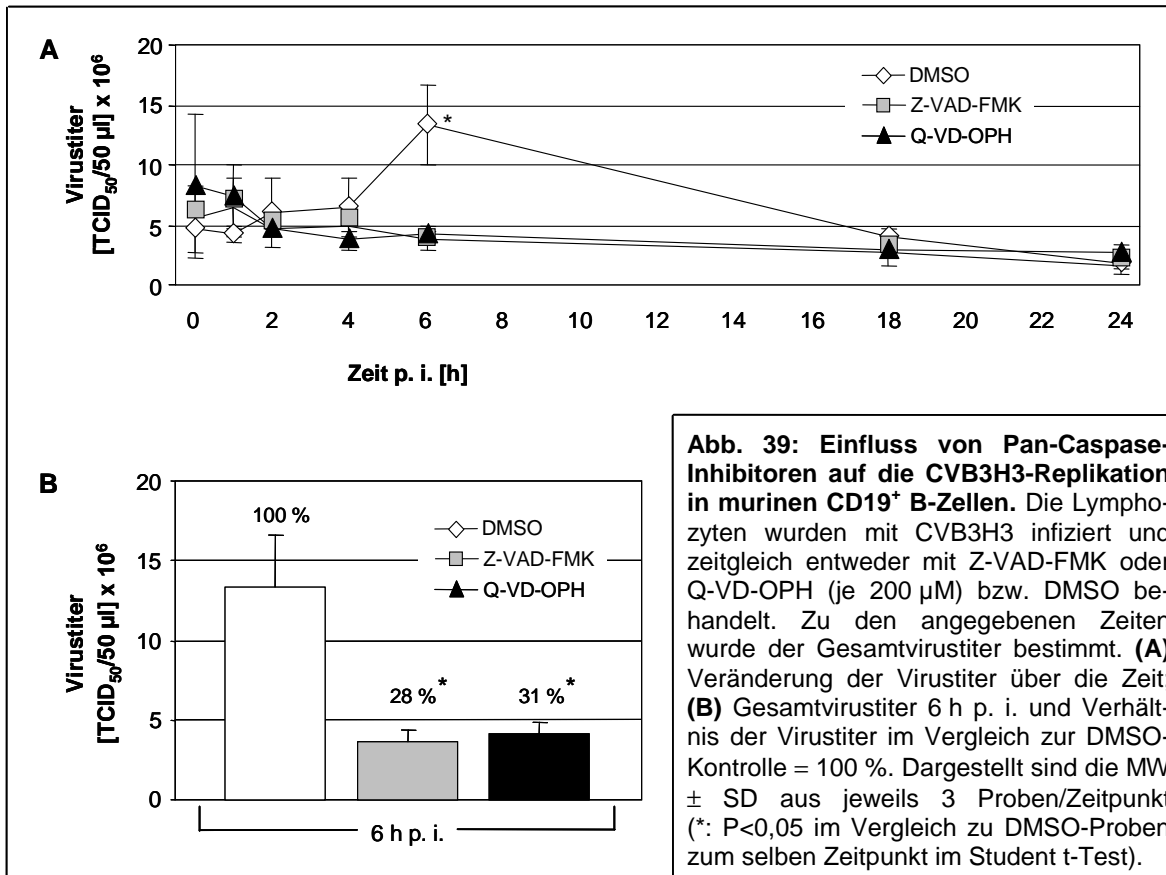
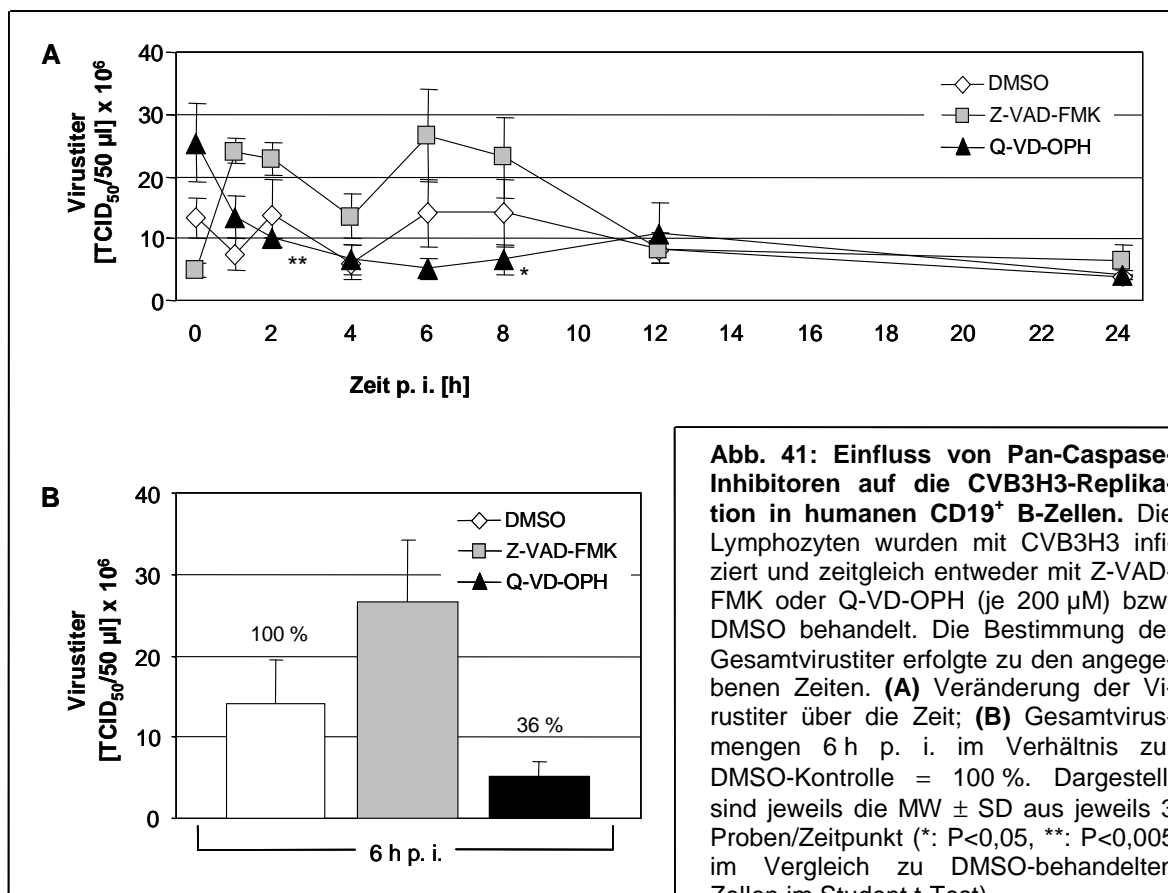


Abb. 40: Einfluss von Pan-Caspase-Inhibitoren auf die intrazellulären Viruskonzentrationen nach einer CVB3-Infektion muriner CD19⁺ B-Lymphozyten. Primäre murine B-Zellen wurden mit CVB3H3 (m.o.i. 5) infiziert und zur gleichen Zeit entweder mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH (je 200 µM) bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Über den angegebenen Beobachtungszeitraum wurden die intrazellulären Virustiter mittels TCID₅₀-Test bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt.

In CVB3H3-infizierten humanen CD19⁺ B-Lymphozyten des peripheren Blutes hatte die Applikation von Q-VD-OPH eine ähnliche Wirkung, wobei die Gesamtvirusmenge zwischen 2 h und 12 h p. i. zum Teil signifikant unter den Werten lag, die für die entsprechenden DMSO-Kontrollen bestimmt wurden (Abb. 41A). Analog zu murinen CD19⁺ B-Zellen konnte durch diesen Caspase-Inhibitor auch in humanen Lymphozyten 6 h p. i. eine Reduktion des Virustiters um mehr als 60 % nachgewiesen werden (Abb. 41B). Abbildung 42 zeigt zudem, dass in Q-VD-OPH-behandelten Kulturen trotz der beobachteten geringen Gesamtvirustiter eine deutliche, wenn auch zeitlich verzögerte Replikation im Inneren der Zellen stattfand. Während in DMSO-Kontrollkulturen ein Anstieg der intrazellulären Virustiter bereits 2 h p. i. erfolgte, kam es nach Zugabe von Q-VD-OPH erst 4 h p. i. zu einer Erhöhung der Partikelkonzentrationen. Die 12 h nach der Infektion ermittelte Menge an intrazellulären Virionen war dann jedoch signifikant ($P < 0,005$) höher als die Titer, welche zum gleichen Zeitpunkt für Kontrollkulturen beobachtet wurden. Zudem konnte nahezu kein Unterschied zwischen den Maximalviruskonzentrationen in DMSO- und Q-VD-OPH-behandelten Zellen festgestellt werden. Lediglich der Zeitpunkt, an dem diese Höchstititer erreicht wurden, war in beiden Kulturen voneinander abweichend.



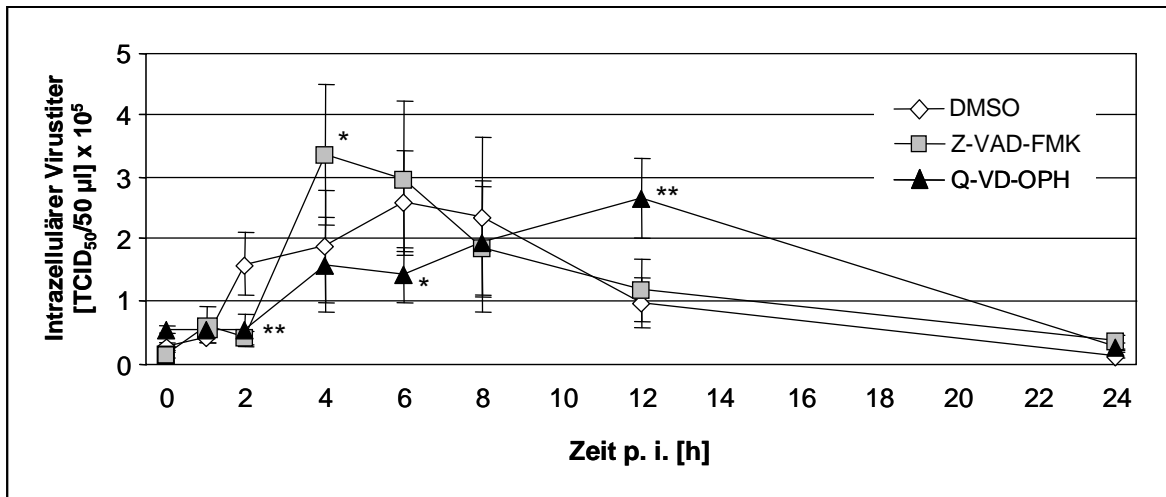


Abb. 42: Einfluss von Pan-Caspase-Inhibitoren auf die intrazellulären Viruskonzentrationen nach einer CVB3-Infektion humaner CD19⁺ B-Lymphozyten. Primäre humane B-Zellen wurden mit CVB3H3 (m.o.i. 5) infiziert und zur gleichen Zeit entweder mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH (je 200 µM) bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Über den angegebenen Beobachtungszeitraum wurden die intrazellulären Virustiter mittels TCID₅₀-Test bestimmt. Dargestellt sind die MW ± SD aus jeweils 3 Proben/Zeitpunkt (*: P<0,05, **: P<0,005 im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle im Student t-Test).

In Z-VAD-FMK-behandelten Kulturen konnte dagegen weder ein inhibitorischer Effekt auf die Gesamtvirustiter noch auf die intrazelluläre Virusvermehrung verzeichnet werden (Abb. 41 und 42). Lediglich eine schnelle Aufnahme infektiöser Partikel ins Innere der Zellen mit sehr hohen Maximaltitern 4 h p. i., welche die der Vergleichskulturen überstiegen, und eine anschließende stetige Abnahme dieser Virusmenge waren zu beobachten.

4.4.2 Einfluss von Caspase-Inhibitoren auf die virale Translation

Die Wirkung der verwendeten Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH auf die Replikation von CVB3H3 in murinen bzw. humanen B-Lymphozyten und somit der Nachweis für eine Interaktion viraler und apoptotischer Prozesse konnte auch auf Translationsebene bestätigt werden. Raji-Zellen wurden dafür mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) infiziert und zeitgleich mit einem der beiden Caspase-Inhibitoren (jeweils 200 µM) versetzt. Da EGFP ausschließlich im Zuge der Prozessierung des viralen Polyproteins gebildet wird, war eine fortschreitende Virusvermehrung mikroskopisch anhand auftretender grünleuchtender Zellen detektierbar. Wie in Abbildung 43 zu erkennen, zeigten DMSO-Kontrollkulturen bereits 7 h p. i. eine Expression von EGFP. Im weiteren Verlauf wurde dann die Menge an grün-fluoreszierenden Signalen aufgrund der Lyse infizierter Zellen erheblich kleiner, was auf ein rapides Fortschreiten der viralen Infektion schließen ließ. Im Gegensatz dazu und den Ergebnissen in Abbildung 38 entsprechend, führte die Zugabe eines der beiden Caspase-Inhibitoren zu einer deutlichen Suppression der viralen EGFP-Produktion. Während die inhibitorische Wirkung von Z-VAD-FMK, wie zuvor bereits beo-

bachtet, nur transient war und somit nach 11 h p. i. eine leichte EGFP-Expression erkennbar war, blockierte Q-VD-OPH die virale Proteinsynthese bis 24 h p. i. nahezu vollständig.

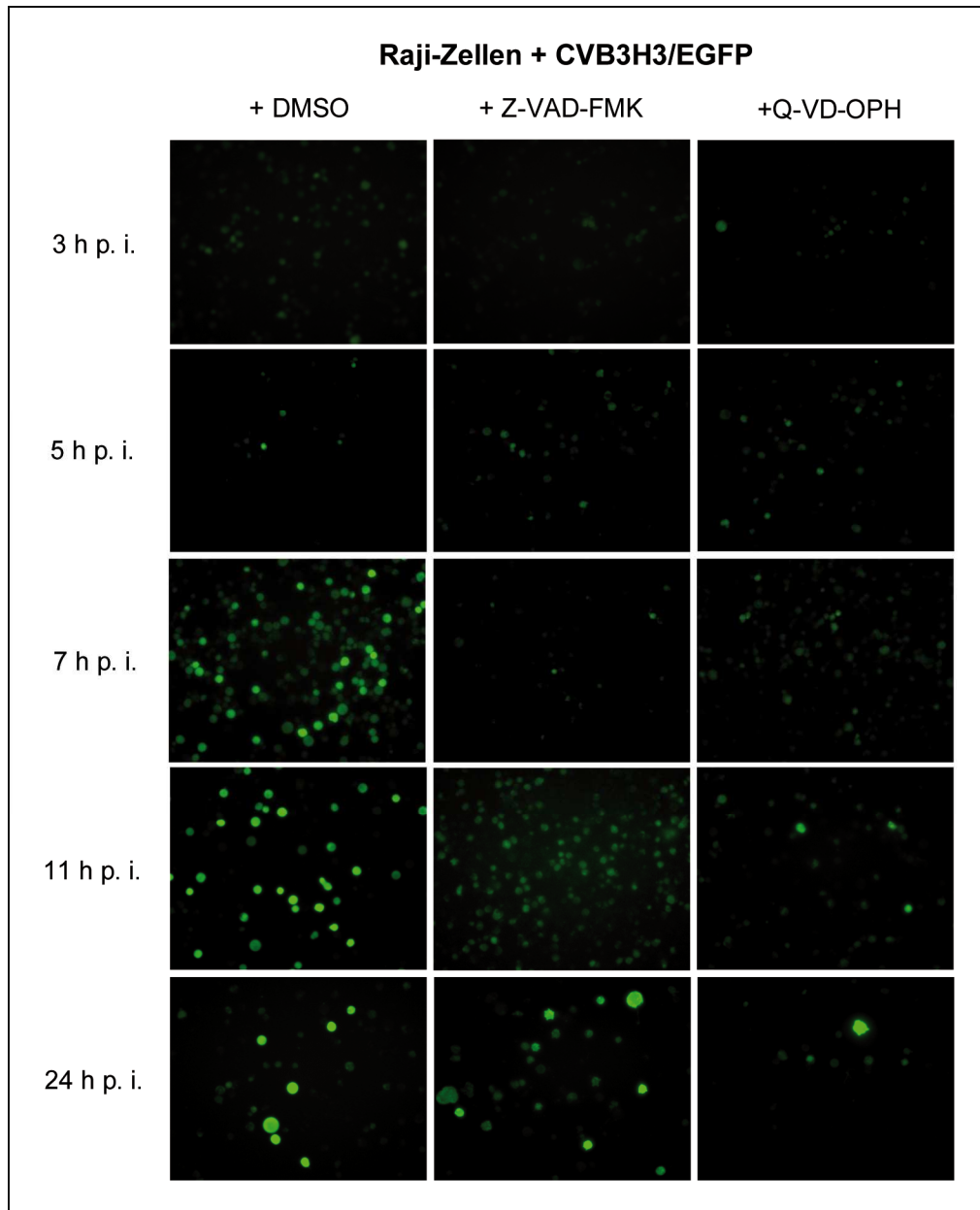


Abb. 43: Nachweis der Hemmung der CVB3-Translation in humanen Raji-Zellen durch die Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren. Raji-Zellen wurden mit CV3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) infiziert und gleichzeitig entweder mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH (jeweils 200 μ M) bzw. DMSO als Kontrolle versetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Detektion des viral gebildeten EGFP mittels Fluoreszenzmikroskopie (Vergrößerung: 400x).

Für die Untersuchung der EGFP-Bildung in CVB3H3/EGFP-infizierten (m.o.i. 5), Inhibitor-behandelten (je 50 μ M/alle 12 h) CD19⁺ B-Lymphozyten aus murinem Milzgewebe erfolgte statt einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse nach 3 d IKZ die Isolation des Gesamtproteins und eine Auftrennung durch SDS-PAGE. Im sich anschließenden Western Blot wurde ein monoklonaler gegen das 27 kDa große EGFP gerichtete Antikörper eingesetzt. Abbildung 44 zeigt, dass in Anwesenheit der beiden Caspase-Inhibitoren deutlich geringere EGFP-Mengen gebildet wurden als in DMSO-behandelten Kontrollen. Dabei hatte Q-VD-OPH einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die virale Proteinsynthese als Z-VAD-FMK. Der Nachweis gleicher Mengen an zellulärem β -Aktin (45 kDa) belegte den Einsatz gleicher Mengen an Protein pro Probe.

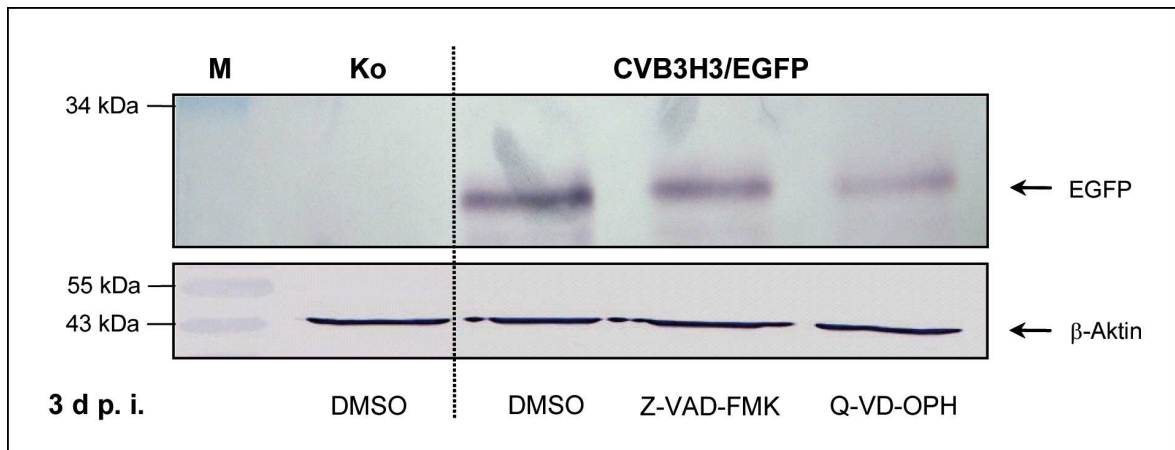


Abb. 44: Einfluss von Pan-Caspase-Inhibitoren auf die virale Translation in CVB3-infizierten murinen CD19⁺ B-Lymphozyten. Zeitgleich mit der CVB3H3/EGFP-Infektion (m.o.i. 2,5) wurden die primären murinen B-Zellen mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH (jeweils 50 μ M) bzw. DMSO als Kontrolle versetzt. Bis 3 d p. i. wurde diese Behandlung im Abstand von 12 h wiederholt. Anschließend erfolgte eine Proteinisolation und die Auftrennung von je 80 μ g Protein (EGFP) bzw. 20 μ g Protein (β -Aktin) pro Probe in einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel. Bei einer anschließenden Western Blot-Analyse wurden spezifische Antikörper zur Detektion von EGFP bzw. β -Aktin eingesetzt (spezifische Signale: EGFP 27 kDa; β -Aktin 45 kDa; M: Proteinmarker, Ko: nicht infizierte Kontrolle + DMSO, CVB3H3/EGFP: infizierte Kulturen + DMSO/Z-VAD-FMK/Q-VD-OPH).

Entsprechende Untersuchungen mit gleichem Versuchsaufbau wurden ebenfalls mit humanen CD19⁺ B-Lymphozyten des peripheren Blutes durchgeführt, wobei in diesem Falle zum Zeitpunkt der Probennahme 3 d p. i., wie Abbildung 45 verdeutlicht, keine Inhibierung der viralen Translation durch einen der beiden Caspase-Inhibitoren mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte. In Kulturen, denen Q-VD-OPH zugesetzt worden war, ließ sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dagegen eine leicht gesteigerte EGFP-Konzentration feststellen.

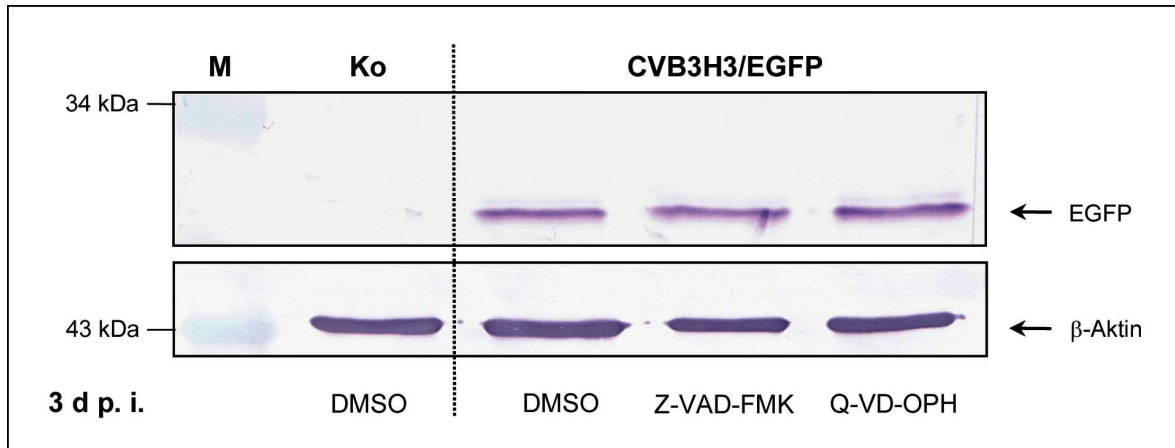


Abb. 45: Wirkung von Pan-Caspase-Inhibitoren auf die CVB3-Translation in infizierten humanen CD19⁺ B-Lymphozyten. Die humanen B-Zellen wurden mit CV3H3/EGFP (m.o.i. 2,5) infiziert und für 3 d inkubiert. Zum Zeitpunkt der Infektion und weiterhin im Abstand von 12 h wurde die Kulturen entweder mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH (jeweils 50 μ M) bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Anschließend erfolgte eine Proteinisolierung und die Auftrennung von je 200 μ g Protein (EGFP) bzw. 40 μ g Protein (β -Aktin) pro Probe in einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel. Bei einer anschließenden Western Blot-Analyse wurden spezifische Antikörper zur Detektion von EGFP bzw. β -Aktin eingesetzt (spezifische Signale: EGFP 27 kDa; β -Aktin 45 kDa; M: Proteinmarker, Ko: nicht infizierte Kontrolle + DMSO, CVB3H3/EGFP: infizierte Kulturen + DMSO/Z-VAD-FMK/Q-VD-OPH).

4.4.3 *In vivo*-Applikation von Caspase-Inhibitoren

Auch während der Pathogenese einer CVB3-induzierten Myokarditis im murinen Tiermodell kommt der Apoptose eine wichtige Bedeutung zu. Abhängig von Mausstamm und Virusvariante können apoptotische Zellen sowohl in inflammatorischen Läsionen aber auch im murinen Herzgewebe abseits entzündlicher Infektionsherde detektiert werden [99, 129]. Basierend auf diesen Daten und aufbauend auf den Ergebnissen der vorangegangenen *In vitro*-Experimente mit murinen CD19⁺ B-Zellen (siehe 4.4.1), sollte der Einfluss der beiden verwendeten Pan-Caspase-Inhibitoren – Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH – auch auf die CVB3-Replikation *in vivo* untersucht werden.

4.4.3.1 Einfluss auf die Viruslast in murinen Geweben

Dazu wurden zunächst männliche BALB/c-Mäusen aus 3 Gruppen 10⁵ pfu/0,2 ml CVB3H3 i. p. injiziert. Da 3 d p. i. die Virusreplikation in den meisten Organen progressiv fortgeschritten ist und die höchste Zahl an CD19⁺ B-Zellen der Milz virusinfiziert ist (Abb. 28C), erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Behandlung der Tiere mit einem der beiden Caspase-Inhibitoren durch i. v. Applikation. Eine Kontrollgruppe erhielt eine entsprechende Menge an DMSO. 6 h nach Gabe dieser Substanzen wurden schließlich allen Tieren Gewebeproben aus Pankreas, Milz und Herz entnommen und für die verschiedenen Untersuchungen vorbereitet. Die Bestimmung der Viruslast in den einzelnen Organen erfolgte mittels TCID₅₀-Test.

Während die Menge an infektiösen Viruspartikeln im Pankreas in den 3 infizierten Testgruppen ähnlich hoch war (Abb. 46A), hatten beide Caspase-Inhibitoren einen Einfluss auf die Virusreplikation im Herz- und vor allem im Milzgewebe. Wie Abbildung 46B/C zeigt, verringerte Z-VAD-FMK die Viruskonzentrationen dabei um 29 % im Myokard und um 46 % in der Milz. Q-VD-OPH hatte einen ähnlich starken Effekt, wobei die Titer um 37 % bzw. 51 % herabgesetzt waren.

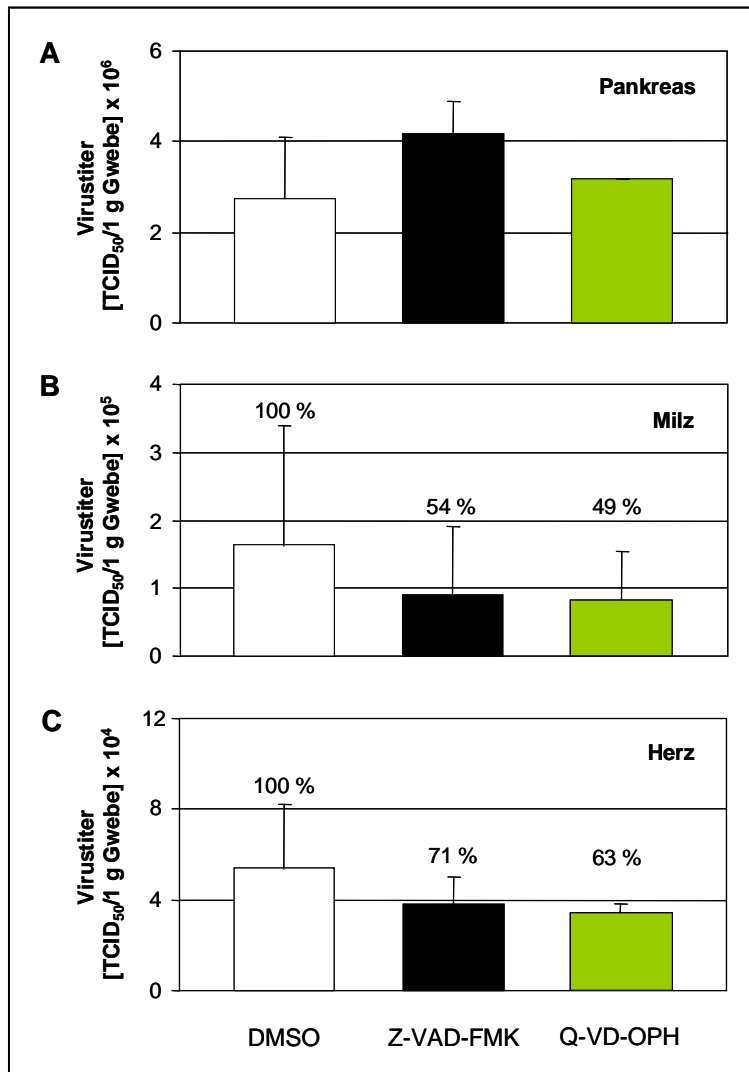


Abb. 46: Viruslast verschiedener muriner CVB3-infizierter Organe nach *In vivo*-Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren. Drei Tage nach Infektion männlicher BALB/c-Mäuse mit 10⁵ pfu CVB3H3 wurde den Tieren entweder Z-VAD-FMK, Q-VD-OPH oder als Kontrolle eine entsprechende Menge an DMSO i. v. verabreicht. Sechs Stunden nach dieser Behandlung erfolgte die Entnahme von Pankreas-, Milz- und Herzgewebe und die Bestimmung der Viruslast mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die MW ± SD aus 3 Tieren/Gruppe; in (B+C) zusätzlich das Verhältnis der Virustiter im Vergleich zur DMSO-Kontrolle = 100 %.

4.4.3.2 Einfluss auf CVB3-infizierte CD19⁺ B-Lymphozyten des Milzgewebes

Aufgrund des relativ starken Effekts beider Caspase-Blocker auf die Virusmenge im murinen Milzgewebe, sollte im Weiteren untersucht werden, ob auch die aus den entsprechenden Organen stammende CD19⁺ B-Zellpopulation durch die Inaktivierung der zellulären Caspasen beeinflusst worden waren. Dafür wurden zunächst die Milzgewebeproben einer Versuchsgruppe gepoolt und homogenisiert. Anschließend erfolgte die Separation

CD19⁺ B-Lymphozyten aus den jeweiligen Milzzellsuspensionen mittels MACS-Technologie. Nach einer RNA-Isolation aus diesen Zellen und Reverser Transkription war, wie Abbildung 47A darstellt, bei allen Proben CVB3-infizierter Mäuse ein Virusnachweis über eine VP1-spezifische PCR möglich. Die Amplifikation des zellulären β -Aktins diente wiederum zur Kontrolle einer erfolgreichen und gleichmäßigen RNA-Isolation und cDNA-Synthese. Zur quantitativen Bestimmung der in den B-Zellen enthaltenen viralen Genome erfolgte zusätzlich eine für eine Sequenz der CVB3-5'-NTR spezifische real time-PCR. Trotz optisch gleichstarker VP1-PCR-Fragmente (Abb. 47A) konnte mit dieser Methode eine deutlich um 55 % bzw. 39 % reduzierte Viruslast in solchen CD19⁺ B-Zellen nachgewiesen werden, welche aus Z-VAD-FMK- bzw. Q-VD-OPH-behandelten Tieren isoliert worden waren (Abb. 47B).

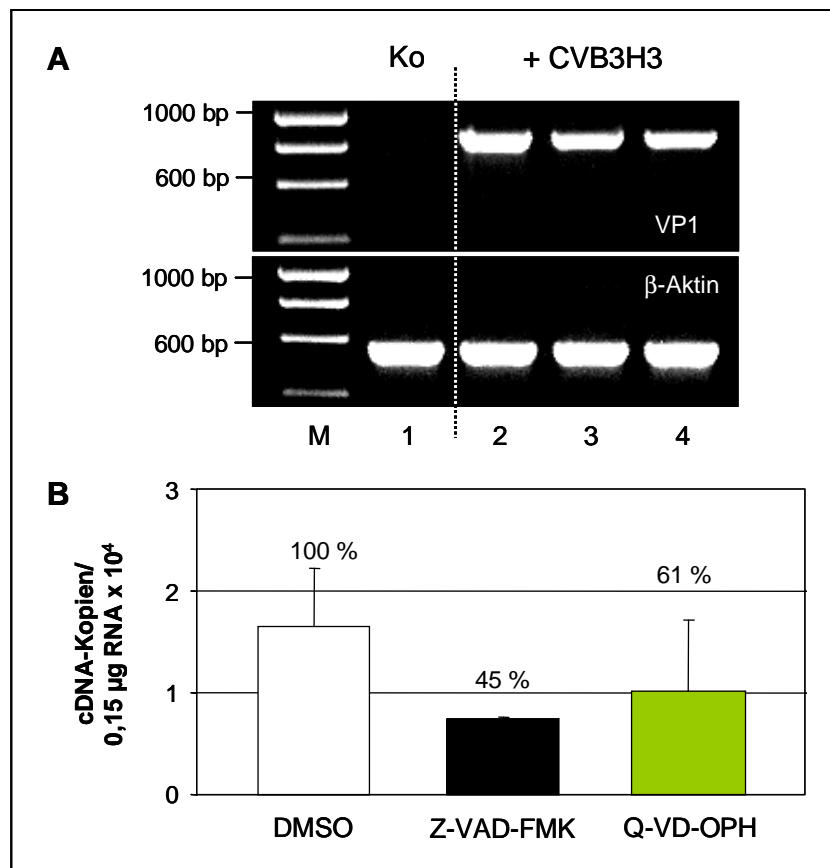


Abb. 47: Analyse CVB3-infizierter CD19⁺ B-Zellen nach *In vivo*-Applikation von Caspase-Inhibitoren. CVB3H3-infizierte BALB/c-Mäuse wurden 3 d p. i. entweder mit Z-VAD-FMK, Q-VD-OPH oder DMSO behandelt. Nach 6 h wurden Milzgewebsproben entnommen und innerhalb einer Gruppe gepoolt. Nach der Selektion CD19⁺ B-Zellen erfolgte die Isolation von RNA, eine RT-PCR und anschließend **(A)** der qualitative Virusnachweis mittels VP1-spezifischer PCR (VP1: 851 bp, μ β -Aktin: 528 bp; M: DNA-Marker, Spur 1: nicht infizierte Kontrolltiere + DMSO [Ko], Spuren 2-4: CVB3H3-infizierte Tiere + DMSO [2], + Z-VAD-FMK [3], + Q-VD-OPH [4]) und **(B)** die quantitative Analyse viraler Genome mittels real time-PCR. In (B) sind die MW \pm SD aus 3 Tieren/Gruppe sowie das Verhältnis im Vergleich zur DMSO-Kontrolle = 100 % dargestellt.

Zudem hatte die *In vivo*-Applikation beider Caspase-Inhibitoren einen Effekt auf die Anzahl infizierter B-Lymphozyten (Abb. 48), die für jede der Versuchsgruppen mittels ICA bestimmt wurde. Während in DMSO-Kontrolltieren wie erwartet nur etwa 0,2 %-0,4 % der CD19⁺ B-Zellen infektiöse Viruspartikel enthielten, führte die Behandlung mit Z-VAD-FMK zur Senkung dieses Prozentsatzes um 23 %. Darüber hinaus hatte die Applikation von Q-VD-OPH, in Übereinstimmung mit den *In vitro*-Experimenten einen noch deutlicheren Effekt. In Tieren, die diesen Pan-Caspase-Inhibitor verabreicht bekamen, war die Anzahl CVB3-infizierter B-Lymphozyten im Vergleich zu DMSO-Kontrollmäusen auf 57 % reduziert.

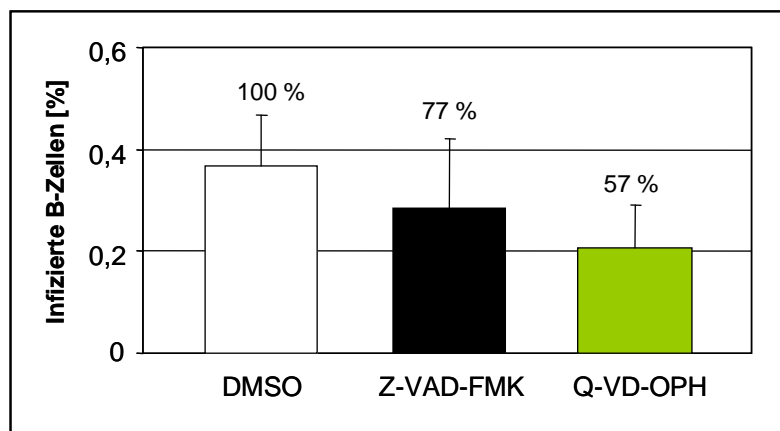


Abb. 48: Analyse CVB3-infizierter CD19⁺ B-Zellen nach *In vivo*-Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren. CVB3H3-infizierte BALB/c-Mäuse wurden 3 d p. i. entweder mit Z-VAD-FMK, Q-VD-OPH oder DMSO behandelt. Nach 6 h wurden Milzgewebeproben entnommen und innerhalb einer Gruppe gepoolt. Nach der Selektion CD19⁺ B-Zellen erfolgte die Bestimmung der Anzahl CVB3-infizierter Zellen mittels ICA. Dargestellt sind die MW \pm SD aus 3 Tieren/Gruppe sowie das Verhältnis im Vergleich zur DMSO-Kontrolle = 100 %.

5. DISKUSSION

Zur Familie der *Picornaviridae* gehören neben Polioviren, Hepatitis-A-Virus und Rhinoviren u. a. auch die Coxsackieviren, welche neben leichten grippeähnlichen Symptomen auch schwerwiegende Erkrankungen wie Pankreatitis, aseptische Meningitis, Hepatitis oder Myokarditis auslösen können [49, 231, 236, 247, 354]. Insbesondere der kardiotope Serotyp B3 verursacht zusammen mit anderen Enteroviren etwa 50 % der akut, subakut und chronisch verlaufenden Entzündungen des Herzmuskels, wobei vor allem Neugeborene und Kleinkinder sowie junge Erwachsene betroffen sind [109]. Aus einer CVB3-induzierten Myokarditis kann sich als Spätfolgeerkrankung eine DCM entwickeln [268], die in 50 % der Fälle einen letalen Ausgang hat. Da bis heute weder die Entwicklung eines Therapeutikums zur Behandlung dieser schweren kardiovaskulären Erkrankungen noch die eines geeigneten Impfstoffes als protektive Maßnahme bis zur klinischen Anwendung entwickelt werden konnte, ist die Prognose in der Regel schlecht. Während die symptomatische Therapie einer Myokarditis vornehmlich auf die Behandlung der kardialen Dysfunktion zielt, bleibt im Falle einer DCM eine Herztransplantation oftmals unvermeidbar. Um eine effektive therapeutische oder protektive Strategie zur Kontrolle der viralen Infektion entwickeln zu können, ist ein möglichst genaues Verständnis der zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen erforderlich.

Trotz der sehr gut charakterisierten molekularbiologischen Eigenschaften von CV der Gruppe B, ist jedoch die Pathogenese einer CVB3-Infektion bis heute nur unzureichend untersucht. Vor allem virale Strategien zur Interaktion mit dem Immunsystems des Wirtes sind noch weitestgehend unbekannt. Durch einige wenige Studien konnte gezeigt werden, dass CVB3 nicht nur in den primären Zielorganen, wie Herz, Pankreas oder ZNS, sondern auch in Immunzellen detektiert werden kann [5, 187, 189, 232]. So konnten sowohl Klingel et al. (1995/96) als auch Anderson et al. (1996) mittels *In situ*-Hybridisierung Immunzellen in Milz und Lymphknoten CVB3-infizierter Mäuse visualisieren, welche virale Plus-Strang-RNA enthielten. Diese positiven Zellen waren dabei in der akuten Phase der Infektion (3-6 d p. i.) in der Peripherie der Keimzentren, einer Zone für den Erstkontakt mit viralen Antigenen, und während der chronischen Entzündung (42 d p. i.) im mittleren Bereich dieser Follikel lokalisiert, der vorwiegend stimulierte Lymphoblasten enthält. Nähere Phenotyp-Analysen mittels einer kombinierten Anwendung von *In situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie identifizierten die virusenthaltenden Zellen zum größten Teil als CD45R⁺ Pre-B- und B-Lymphozyten [189]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten in CVB3-infizierten B-Zell-Knockout-Mäusen 3 d p. i. keine virus-positiven Zellen in den Follikeln der Milz detektiert werden [232]. Zusätzlich war es möglich, sowohl in der akuten als

auch in der chronischen Phase der Infektion mittels strangspezifischer RT-PCR und *In situ*-Hybridisierung auch virale Negativ-Stränge in Splenozyten bzw. B-Zellen der Milz und der Lymphknoten infizierter Mäuse nachzuweisen, was nicht nur eine Anwesenheit des Virus, sondern auch eine Replikation von CVB3 in diesen Zellen vermuten ließe [5, 189]. Die bloße Anwesenheit dieser Minus-RNA ist jedoch kein Beleg für eine produktive Virusvermehrung, infolge derer es zu einer Freisetzung infektiöser Partikel kommt, da CVB3 in der Lage ist, verschiedene Gewebe und Zelltypen, darunter auch lymphoide Zellen, persistent zu infizieren [6, 226, 286]. Zum anderen konnte erst kürzlich am murinen Modell der CVB3-induzierten Myokarditis gezeigt werden, dass unter bestimmten experimentellen Bedingungen 5'-trunkierte Negativ-Strang-RNA-Moleküle in virale Kapside verpackt werden. Diese so genannten CVB3/TD („terminally deleted“)-Virionen sind *in vitro* nicht lytisch und zudem in der Lage, zu replizieren sowie *in vivo* zu persistieren [160, 179, 180]. Daher gibt eine Detektion viraler Minus-RNA-Stränge in B-Zellen mittels *In situ*-Hybridisierung oder strangspezifischer RT-PCR lediglich einen Hinweis auf eine potentielle CVB3-Replikation. Erweiterte Untersuchungen zur Infektion von B-Lymphozyten *in vivo* wurden 1999 von Mena et al. durchgeführt. Dabei wurden diese Zellen aus Splenozyten-Suspensionen CVB3-infizierter C57BL/6-Mäuse durch eine Inkubation auf Anti-IgG-beschichteten Petrischalen isoliert, verdünnt und auf konfluenten GMK-Zellrasen in ICA aufgetragen (siehe 3.2.4). Da nach 36 h eine deutliche Plaquebildung zu erkennen war, wurde auf eine in den B-Lymphozyten stattfindende CVB3-Replikation mit anschließender Freisetzung infektiöser Partikel geschlossen [232]. Doch auch mit dieser Methode ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen lediglich oberflächengebundenen infektiösen Viruspartikeln und im Zuge einer Virusvermehrung im Inneren der Zellen neu gebildeten Virionen nicht möglich. Somit konnte eine aktive Replikation von CVB3 in murinen B-Lymphozyten des Milzgewebes bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden.

5.1 Aktive Replikation von CVB3 in primären murinen und humanen CD19⁺ B-Lymphozyten

Ausgehend von den zuvor beschriebenen, bis dato unzureichenden Kenntnissen zur Infektion muriner B-Lymphozyten, erfolgte in der vorliegenden Arbeit zunächst eine genauere Analyse zur aktiven Replikation von CVB3 in diesen Immunzellen. Dazu wurde eine rekombinante CVB3-Variante – CVB3H3/EGFP – verwendet, welche ausschließlich im Zuge der viralen Replikation das Reporterprotein EGFP exprimiert [85, 308]. Findet keine aktive Virusvermehrung im Inneren einer CVB3H3/EGFP-infizierten Zelle statt, ist die Bildung von EGFP nicht möglich. Gewährleistet wird dies infolge einer künstlichen Insertion der entsprechenden EGFP-Gensequenz in den offenen Leserahmen von CVB3H3. Nach

der viralen Translation wird das zusätzlich produzierte Protein durch die virale 3C-Protease an einer zusätzlich eingebrachten 3C-Schnittstelle vom Polyprotein abgespalten und wie die anderen viralen Proteine im Zytoplasma freigesetzt. Somit ist es möglich, eine im Inneren einer Zelle oder eines Zellverbandes stattfindende Virusinfektion zu detektieren bzw. zu verfolgen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Virus, wie andere rekombinante Varianten auch, im Vergleich zum Wildtyp CVB3H3 und in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellkultur eine leicht verzögerte Wachstumskinetik zeigt [85]; grundsätzlich jedoch einen normalen Vermehrungszyklus durchläuft.

Zunächst wurde untersucht, ob die beschriebene Empfänglichkeit der humanen lymphoiden B-Zelllinie Raji für CVB3 [348] auch mit der entsprechenden rekombinanten Variante bestätigt werden kann. Wie Abbildung 5 deutlich zeigt, findet bereits 7 h nach einer Infektion mit dem EGFP-exprimierenden Virus in den ersten Zellen eine fluoreszenzmikroskopisch sichtbare Bildung des Reporterproteins im Zytoplasma statt, was eine virale Replikation bestätigt. Im Folgenden wurde dann diese CVB3-Suszeptibilität auch für primäre CD19⁺ B-Zellen untersucht, welche mittels MACS-Technologie mit einer nachgewiesenen Selektionsspezifität von > 99,9 % (Abb. 6A) aus Milzgeweben nicht infizierter BALB/c-Mäuse isoliert wurden. Da eine Virusreplikation von der zellulären Transkriptions- und Translationsmaschinerie und somit vom Vitalitätszustand der infizierten Zelle abhängig ist, wurde zusätzlich im Anschluss an die CD19-spezifische Isolation von B-Lymphozyten eine Trypanblaufärbung vorgenommen. Dabei waren nahezu alle Zellen in der Lage, ein Eindringen des Farbstoffs ins Zytosol zu verhindern, was auf eine wenig eingeschränkte Lebensfähigkeit schließen lässt (Abb. 6B). Zudem zeigten, wie die Abbildungen 33, 34 und 36 verdeutlichen, mittels MACS isolierte murine und humane CD19⁺ B-Lymphozyten die Fähigkeit, in einem colorimetrischen Proliferationstest WST-1 in farbiges Formazan umzusetzen, was eine Stoffwechselaktivität der Zellen voraussetzt. Außerdem war es möglich diese Lymphozyten mittels LPS zu stimulieren (Abb. 35 und 37). Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass die verwendete MACS-Methode keinen Einfluss auf den Vitalzustand und die Stoffwechselaktivität der isolierten CD19⁺ B-Lymphozyten hat.

Daraufhin erfolgte die Infektion dieser B-Zellpopulation mit CVB3H3/EGFP und eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten p. i. Überraschenderweise war dabei jedoch weder eine Veränderung der Zellmorphologie noch eine Expression von EGFP im Zytoplasma sichtbar. Auch bei einer durchflusszytometrischen Analyse infizierter B-Lymphozyten 3 d p. i. konnte nur bei ca. 0,03 % der Zellen eine EGFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Dagegen wiesen bereits 20 h p. i. ca. 48 % der als Fluoreszenzreferenz verwendeten CVB3H3/EGFP-infizierten Raji-Zellen deutliche

EGFP-Signale auf (Abb. 7). Da auch in verschiedenen anderen Studien vermutet wurde bzw. gezeigt werden konnte, dass wahrscheinlich nur ein sehr geringer Prozentsatz an B-Lymphozyten der Milz (etwa 1-10 %) durch CVB3 infiziert wird [5, 189, 232, 348], erfolgte eine zusätzliche Analyse mittels Western Blot. Um dabei eine möglichst hohe Anzahl tatsächlich infizierter Zellen zu erreichen, wurde eine große Anzahl an Lymphozyten eingesetzt (4×10^7) und für 2 d bzw. 3 d mit CVB3H3/EGFP (m.o.i. 5) inkubiert. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, konnte nach dem Auftragen einer vergleichsweise großen Menge an Gesamtprotein (390 µg) mit dieser Methode eine virale EGFP-Produktion nachgewiesen werden, wobei zudem eine Intensitätszunahme der spezifischen Bande von 2 d zu 3 d p. i. erkennbar war. Dieses Ansteigen der EGFP-Konzentrationen im Verlauf der CVB3-Infektion lässt auf eine im Inneren der Zellen stattfindende Replikation schließen. Nicht infizierte Kontrollkulturen wiesen dagegen diese bei 27 kDa detektierte Bande nicht auf, was eine Spezifität der nachgewiesenen Signale unterstreicht. Die fehlgeschlagene bzw. nur geringfügige Detektion von viral gebildetem EGFP in infizierten B-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie könnte zum einen in der geringen Größe und dem Kern-Plasma-Verhältnis dieser Zellen und zum anderen in einer scheinbar begrenzten Empfindlichkeit der B-Lymphozyten begründet sein. Im Gegensatz zu anderen Zellen erscheinen sie im Lichtmikroskop einheitlich und weisen im undifferenzierten Zustand einen großen runden Kern mit überwiegend kondensiertem Chromatin auf. Das organellenarme Zytoplasma ist auf einen um den Nukleus befindlichen dünnen Saum beschränkt. Erst nach der Differenzierung wird die Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Zytoplasmas verschoben. Da sich die verwendeten CD19⁺ B-Lymphozyten nach der Isolation aus nicht infiziertem murinen Milzgewebe größtenteils in einem undifferenzierten Zustand befanden und somit eine nur marginale Zytoplasmafraktion enthielten, konnte vermutlich nur sehr wenig viral gebildetes EGFP im Zytosol akkumuliert werden, was eine auf Fluoreszenzsignalen basierende Detektion verhinderte. Das positive Resultat der Western Blot-Analyse beruht daher zum einen auf der nicht an Fluoreszenz-gebundenen Visualisierung des viral gebildeten EGFP und zum anderen auf der großen Menge an aufgetragenem Gesamtprotein. Im Gegensatz dazu weisen Raji-Zellen aufgrund des integrierten Wildtyp-EBV-Genoms einen immortalisierten Phenotyp auf und sind infolgedessen in der Lage, sich ständig zu teilen. Dieser stetige Aktivierungszustand und das normale Kern-Plasma-Verhältnis dieser Zellen gewährleisteten vermutlich die beobachtete uneingeschränkte Replikation von CVB3H3/EGFP und damit eine deutliche fluoreszenzmikroskopisch detektierbare EGFP-Produktion (Abb. 5 und 7).

Vergleichende Untersuchungen wurden auch mit primären humanen CD19⁺ B-Lymphozyten durchgeführt, welche ebenfalls mittels MACS-Technologie, in diesem Fall

jedoch nicht aus Milzgewebe, sondern aus peripherem Blut gesunder Spender, isoliert wurden. Ebenfalls mit Hilfe der rekombinanten EGFP-exprimierenden Virusvariante konnte dabei erstmalig gezeigt werden, dass CVB3 in der Lage ist, auch in humane B-Lymphozyten einzudringen und eine aktive Replikation durchzuführen (Abb. 9). Auch hier war, vermutlich basierend auf den bereits oben für murine B-Zellen beschriebenen Gründen, eine Detektion des Reporterproteins mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich. Diese virale Strategie, B-Lymphozyten des Blutes zu infizieren, wurde ebenfalls für das humane Epstein-Barr-Virus (Humanes Herpesvirus-4) aus der Gruppe γ -Herpesviren beschrieben, wobei es in diesem Fall jedoch zu einer latenten Infektion kommt und die Zellen als lebenslanges Virusreservoir dienen [51, 83].

Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der erwähnten Studien am murinen Modell der virusinduzierten Myokarditis lässt sich feststellen, dass CVB3 murine CD19⁺ Milz-B-Zellen sowie humane periphere CD19⁺ B-Lymphozyten infiziert und aktiv in diesen Zellen repliziert. Die bei der Detektion des viral gebildeten EGFPs aufgetretenen Schwierigkeiten deuten zudem darauf hin, dass diese Replikation vermutlich sehr eingeschränkt stattfindet und dass nur eine geringe Zahl an B-Zellen infiziert wird bzw. empfänglich für CVB3 ist. Eine weitere, jedoch relativ unwahrscheinliche, Möglichkeit wäre zudem, dass zwar eine Vielzahl CD19⁺ B-Zellen infiziert wird, eine virale Replikation jedoch nur in einem geringen Prozentsatz an Lymphozyten stattfindet.

5.2 Aufnahme von CVB3 in CD19⁺ B-Lymphozyten

5.2.1 Expression des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors

Die Fähigkeit viraler Pathogene einen Wirt bzw. eine Wirtszelle zu infizieren, ist abhängig von der Präsenz eines geeigneten zellulären Rezeptors. Dies bedingt wiederum das virale Wirtsspektrum und insbesondere den Gewebetropismus [144]. Viele Enteroviren [17, 177], darunter einige CV der Gruppe B (CVB1/3/5), binden an das 70 kDa große Zelloberflächenprotein DAF/CD55, dessen zelluläre Funktion in der Regulation der Komplementkaskade liegt. Da DAF jedoch nicht die Internalisierung der Virionen vermitteln kann, sondern nur zur Adhäsion dient und damit lediglich einen Corezeptor darstellt [20, 299, 300], ist für den Eintritt in die Zielzellen ein weiteres Molekül nötig. Dieses wurde 1997 beschrieben, vermittelt die Aufnahme aller sechs Coxsackie B-Serotypen sowie einiger Adenoviren und wird daher als Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet [18, 211]. Das murine Pendant muCAR wurde später von Tomko et al. und Bergelson et al. identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Rezeptor-negative, nicht susceptible Zellen nach Transfektion mit muCAR-cDNA empfänglich für CVB3 und verschiedene Adenoviren wurden, was ebenfalls auf eine muCAR-vermittelte Internalisierung der Viruspartikel

schließen ließ [19, 334]. Die Bindung von CVB3 an CAR bedingt eine Konformationsänderung im viralen Kapsid. Dieser Prozess wird als essentiell für die Freisetzung der viralen RNA ins Zytoplasma der Wirtszelle angesehen [142, 233]. Untersuchungen zur Expression von hu/muCAR in verschiedenen humanen und murinen Organen mittels Northern Blot-Analyse ergaben eine weite Verbreitung von CAR, wobei Gewebe wie Pankreas, ZNS, Herz oder Dünndarm die stärksten Signale zeigten. Im Gegensatz dazu konnte in menschlichen Proben aus Thymus, Milz oder Blutleukozyten sowie im Milzgewebe immunkompetenter Mäuse keine Expression von CAR festgestellt werden [19, 334].

Ausgehend von der Diskrepanz zwischen dem beschriebenen CAR-Verbreitungsmuster und der zuvor festgestellten Suszeptibilität muriner und humaner CD19⁺ B-Zellen der Milz bzw. des peripheren Blutes wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Untersuchungen zur Expression von CAR in diesen Lymphozyten durchgeführt. Die Detektion und Quantifizierung der jeweiligen mRNA-Mengen für muCAR bzw. huCAR erfolgte dabei mittels spezifischer real time-PCRs. In Übereinstimmung mit den zuvor erwähnten Studien und unabhängig vom genetischen Hintergrund konnten für murine Herzproben sehr hohe muCAR-mRNA-Mengen nachgewiesen werden (Abb. 10). Das Pankreasgewebe zeigte hingegen sehr viel niedrigere Expressionsraten. Darüber hinaus waren auch in der Milz geringe (1/10 bzw. 1/15 im Vergleich zum Herzgewebe) aber deutliche und vor allem spezifische Signale für muCAR detektierbar, was im Widerspruch zu den Northern Blot-Untersuchungen von Tomko et al. (1997) und Bergelson et al. (1998) steht, jedoch vermutlich in der hohen Sensitivität und Spezifität der Methode begründet liegt. Trotz dieser Sensitivität der verwendeten real time-PCR konnte jedoch weder für Milzzellsuspensionen noch für murine CD19⁺ B-Lymphozyten des Milzgewebes eine Expression von muCAR detektiert werden. Dies wurde anschließend auch auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 12A). Die schwache im Gesamtmilzgewebe detektierte Transkription von muCAR findet daher vermutlich in Bindegewebs- oder Endothelzellen dieses Organs statt. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Mena et al. (1999), die gleichermaßen Untersuchungen zur Expression von muCAR in murinen B-Zellen durchführten. Dabei war ebenfalls eine Detektion von muCAR, in diesem Fall jedoch mittels RT-PCR, nicht möglich. Lediglich durch eine Southern Blot-Analyse der durch PCR amplifizierten cDNA-Proben war eine schwache muCAR-Bande nachweisbar. Vermutet wurde jedoch, dass dieses positive Signal das Resultat einer Kontamination der Lymphozytensuspensionen mit Nicht-B-Zellen war, da dies aufgrund der verwendeten Selektionsmethode für B-Zellen über Antikörper-beschichtete Petrischalen relativ wahrscheinlich ist [232]. Im Gegensatz zum murinen Homolog konnte die Expression von huCAR sowohl in den als Positivkontrolle verwendeten Raji-Zellen als auch in primären PBMCs und CD19⁺ B-Zellen humaner

Spender mittels real time-PCR nachgewiesen werden, wobei die mRNA-Mengen im Lymphozytengemisch etwa 10-12 mal höher waren als die in Raji- und CD19⁺ B-Zellen (Abb. 11). Die folgende Western Blot-Analyse zeigte jedoch, dass trotz dieser scheinbar stattfindenden Transkription des humanen CAR-Gens ein Nachweis des entsprechenden Proteins nicht möglich war (Abb. 12B). Ausschließlich Raji-Zellen wiesen das 46 kDa große huCAR-Molekül auf. Aufgrund der Detektion geringer Mengen an huCAR-mRNA kann jedoch ein Vorhandensein einzelner CAR-Moleküle auf humanen CD19⁺ B-Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass murine CD19⁺ B-Lymphozyten das für die Internalisierung von CVB3 verantwortliche Rezeptorprotein muCAR nicht bilden, womit ein Viruseintritt über dieses Molekül ausgeschlossen werden kann. Humane CD19⁺ B-Lymphozyten synthetisieren im Gegensatz dazu zwar in geringem Maße huCAR-spezifische mRNAs, bilden jedoch das entsprechende Protein allenfalls in sehr geringen Mengen, was vermuten lässt, dass eine virale Penetration dieser Zellen nicht durch huCAR vermittelt wird. Da jedoch, wie unter 5.1. beschrieben, sowohl in murinen als auch in humanen CD19⁺ B-Lymphozyten eine aktive Replikation von CVB3 stattfindet, müssen andere Faktoren oder Mechanismen existieren, die ein Eindringen in diese Immunzellen ermöglichen bzw. fördern.

5.2.2 Antikörper-vermittelte CVB3-Aufnahme in murine und humane CD19⁺ B-Zellen

Neben der typischen im Zuge der Infektion einer Wirtszelle stattfindenden viralen Interaktion mit spezifischen zellulären Oberflächen-Rezeptoren bzw. Corezeptoren sind einige Viren für eine effiziente Penetration bestimmter Targetzellen auf das Vorhandensein virusspezifischer Antikörper angewiesen. Die normalerweise für eine Virusneutralisation verantwortlichen Moleküle wirken dann unter Umständen potenzierend auf die virale Infektion und das dadurch zustande kommende Krankheitsbild. Dieses als „antibody-dependent enhancement“ (ADE) bezeichnete Phänomen wurde zum ersten Mal in den 60er Jahren durch Hawkes et al. beschrieben und ist seither sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für eine Reihe von Vertretern der unterschiedlichsten Virusfamilien belegt worden [123, 124]. Dazu zählen u. a. Flaviviren, wie das Gelbfieber-Virus [282], die Dengue-Viren [118, 119, 208], das West-Nil-Virus und das Japanische Enzephalitis-Virus [123, 124] aber auch HIV-1 [145, 270, 321], das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) [102], das Ebola-Virus [319] und Influenza-A-Viren [251, 324]. Diese Viren sind zumeist in der Lage, Immunzellen zu infizieren, die Produktion einer großen Menge an Antikörpern zu induzieren und persistierende Infektionen auszulösen [331]. Die bis dato bekannten Mechanismen, welche eine Antikörper-abhängige virale Penetration suszeptibler Zellen ermögli-

chen, können anhand der involvierten zellulären Oberflächenmoleküle grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: FcγR-abhängig und Komplement-abhängig [318].

Der von den meisten Viren verwendete Mechanismus ist dabei das FcγR-vermittelte ADE [120], wobei es zu einer Interaktion zwischen Virus-Antikörper-Komplexen und FcγR-tragenden Zellen kommt, indem der Fc-Teil des Immunglobulins an das Rezeptormolekül bindet. Dabei unterstützen meist nur Antikörper der Klasse IgG eine Verstärkung der viralen Infektion, während IgM-Antikörper eher zu einer Virusneutralisation führen [118, 124]. Zellen, die einen oder mehrere der vier FcγR-Typen aufweisen, sind dabei meist Komponenten des Immunsystems wie Makrophagen, Monozyten, B-Lymphozyten, Neutrophile oder Granulozyten [246, 318]. Eine Virusgruppe, für die dieser ADE-Mechanismus häufig beschrieben wurde, ist die Familie der *Flaviviridae*, wobei der Antikörper-vermittelte Eintritt in FcγR-tragende Targetzellen und ein damit verbundenes schwerwiegendes Krankheitsbild vor allem für die vier Dengue-Virus (DV)-Typen in den letzten Jahrzehnten ausführlich charakterisiert wurde. So konnte bereits 1970 ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des durch diese Viren verursachten Dengue-Fiebers bei Kindern und dem Vorhandensein virusspezifischer maternalen Antikörper festgestellt werden [116, 117]. Dies wurde ebenfalls in Rhesusaffen beobachtet und durch weiterführende Ergebnisse bestätigt [115]. Epidemiologische Relevanz hinsichtlich der Verstärkung des Krankheitsbildes erlangte das ADE durch ein Infektionsgeschehen in Thailand bei dem seropositive Kinder nach Neukontakt mit einem anderen DV-Typ schwersten Formen des Dengue-Hämorrhagischen Fiebers (DHF) und des Dengue-Schock-Syndroms (DSS) entwickelten [114]. Zudem zeigte eine neuere klinische Studie, dass Patienten, welche bereits eine Infektion mit einem der DV-Typen durchgemacht hatten und nachfolgend nochmals mit DV-2 in Kontakt kamen, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines DSS aufwiesen als seronegative Patienten, wobei die Kombination aus DV-1 und DV-2 die schwerwiegendsten Folgen hatte [43]. Aber auch andere Viren, wie HIV-1 [145, 195, 321, 340] oder das Maul- und Klauenseuche-Virus [224] sowie Adenoviren [197] nutzen den FcγR-abhängigen Weg des ADE.

Der zweite Mechanismus bedient sich unterschiedlicher Komponenten des Komplementsystems, wie z. B. Komplement-Rezeptoren (KR), welche nicht nur auf Immunzellen, sondern auf den verschiedensten Zelltypen vorkommen. Diese Strategie wurde zum ersten Mal durch Cardoso et al. (1983) beschrieben. Dabei konnte das ADE einer West-Nil-Virus-Infektion in FcγR-tragenden Zellen nicht durch den Einsatz eines Anti-FcγR-Antikörpers inhibiert werden, während hingegen durch einen monoklonalen Antikörper gegen den KR3 eine nahezu vollständige Blockierung erreicht wurde [29]. Vermutlich bindet dabei die Komplement-Komponente C1q in unmittelbarer Nähe zueinander liegende

Fc-Teile der Virus-Antikörper-Komplexe, wodurch es anschließend zur Aktivierung einer Komplementkaskade kommt, infolge derer z. B. das C3b-Fragment an seinen Rezeptor bindet und eine Internalisierung des Virus veranlasst. Für HIV-1 wurde eine Beteiligung des KR2 und CD4 am Komplement-abhängigen ADE beschrieben [107, 270, 271, 339]. Bei Infektionen mit Ebola-Virus konnte die Komplement-Komponente C1q als entscheidender Mediator für ein ADE identifiziert werden [317, 319], wobei es nach dessen Interaktion mit Viruspartikel-gebundenen Antikörpern nicht zur Aktivierung einer Komplement-Kaskade, sondern vermutlich zu einer direkten Bindung dieses Virus-Antikörper-C1q-Komplexes an einen zellulären C1q-Rezeptor kommt [73, 244].

Zusätzlich wurde kürzlich bei HIV-1 ein weiterer FcγR- und Komplement-unabhängiger ADE-Mechanismus *in vitro* beschrieben, der als Rezeptor-aktiviert bezeichnet wird. Dabei binden monoklonale Antikörper an die den viralen Rezeptor erkennende Stelle am gp120-Glykoprotein der Virushülle und verursachen dadurch eine Konformationsänderung, die trotz einer hohen Antikörperkonzentration die Bindung von HIV-1 an seinen Rezeptor und so einen verstärkten Eintritt in die Targetzelle ermöglicht [110, 289, 312].

Hinsichtlich einer durch virusspezifische Antikörper vermittelten Verstärkung des Viruseintritts bzw. der viralen Infektiosität liegen, im Vergleich zu anderen Virusfamilien, für Picornaviren nur wenige Daten vor. Mason et al. (1993) und Baxt et al. (1995) konnten zeigen, dass Antikörper-komplexiertes Maul- und Klauenseuche-Virus über einen FcγR-abhängigen Weg in der Lage ist, Virusrezeptor-freie CHO-Zellen sowie murine und porzine Makrophagen zu infizieren und eine aktive Replikation in den Immunzellen durchzuführen [15, 224]. Für Poliovirus wurde zudem eine erfolgreiche Infektion nicht susceptibler muriner L-Zellen in Anwesenheit von Anti-Poliovirus-Antikörpern beschrieben, wenn diese den hochaffinen FcγRI stabil exprimierten [8]. Im Jahre 2001 erschienen Studien, welche erstmalig eine Antikörper-vermittelte Infektion von Zellen durch CV identifizierten. Dabei war die Infektiosität von CVB4 für primäre humane CD14⁺ Monozyten in einem PBMC-Gemisch um das 100-fache gesteigert, wenn das Virus mit nicht neutralisierenden, virus-spezifischen Antikörpern vorbehandelt wurde. Erfolgte diese Vorinkubation mit reinem humanen Plasma oder neutralisierenden Antikörpern, war die coxsackievirale Infektionsrate stark verringert. Zudem produzierten diese Monozyten deutlich erhöhte Mengen an Interferon-α (IFN-α) [40, 140]. Eingehendere Untersuchungen zeigten später auch eine Anti-CVB3-Antikörper-abhängige Steigerung der CVB3-induzierten IFN-α-Produktion in humanen PBMCs und konnten für beide CVB-Typen eine Beteiligung VP4-spezifischer Immunglobuline an diesem Prozess identifizieren [41, 278]. Zwei weitere Studien zur Infektion der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinien J774.1 bzw. P388D1 mit CVB3 konnten ebenfalls *in vitro* eine Antikörper-vermittelte Steigerung der Virustiter um das 10-

50-fache nachweisen [103, 184].

Ausgehend von diesen Studien und im Hinblick auf die zuvor festgestellte fehlende bzw. marginale Expression des coxsackieviralen Rezeptors CAR auf der Oberfläche muriner und humaner CD19⁺ B-Lymphozyten (siehe 5.2.1) wurde in eigenen Experimenten die Möglichkeit einer Antikörper-vermittelten Penetration dieser Immunzellen durch CVB3 untersucht. Dazu erfolgte vor Infektion der jeweiligen primären CD19⁺ Zellen eine Vorinkubation der in Relation zur Zellzahl stets konstanten Menge an CVB3 in Ab- oder Anwesenheit virusspezifischer Antikörper. Die optimale Verdünnung der dafür verwendeten Anti-CVB3-Seren aus infizierten Mäusen bzw. einer seropositiven Spender-Person wurde durch Vorversuche bestimmt (Daten nicht gezeigt). Während das humane Serum in allen nachfolgenden Untersuchungen aufgrund einer hohen Konzentration an spezifischen neutralisierenden Anti-CVB3-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde, erbrachte das murine Serum 1:100-verdünnt viel versprechende Resultate. In den entsprechenden Kontroll-Seren aus einem seronegativen Spender bzw. aus nicht infizierten Mäusen konnten keine neutralisierenden Anti-CVB3-Antikörper nachgewiesen werden. Um herauszufinden, welchen Einfluss eine Vorinkubation mit virusspezifischen Antikörpern auf die Aufnahme von CVB3 in CD19⁺ B-Zellen und den viralen Vermehrungszyklus hat, wurde die intrazelluläre Konzentration infektiöser Viruspartikel über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Dabei zeigte sich in murinen CD19⁺ B-Zellen der Milz, dass in Abwesenheit CVB3-spezifischer Antikörper zu Beginn der Infektion (2-3 h p. i.) nur eine sehr geringe Menge an Virionen aufgenommen wurde, die zwar zwischen 4-6 h p. i. einer Eclipse gleichkommend absank, anschließend jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht über die Ausgangskonzentration anstieg und 24 h p. i. nahezu nicht mehr nachweisbar war (Abb. 13A). Dies weist, wie schon unter 5.1 vermutet, auf eine extrem geringe Anzahl empfänglicher CD19⁺ B-Zellen hin und bestätigt die Ergebnisse von Mena et al. *in vivo* und Anderson et al. *in vitro*, die ebenfalls eine sehr geringe Infektionsrate primärer muriner B-Zellen bzw. Splenozyten feststellten [5, 232]. Wurde die Virussuspension vor Infektion jedoch mit verdünntem CVB3-spezifischen Serum versetzt, war bereits 2 h p. i. die Aufnahme infektiöser Partikel im Vergleich zu den Kontrollkulturen etwa um das 5-fache gesteigert (Abb. 13B). Kurz darauf (3-6 h p. i.) sank der Virustiter deutlich ab, was auf die für eine virale Infektionskinetik typische „uncoating“-Phase hindeutet, während der nur wenige infektiöse, durch ein Kapsid umhüllte Virionen in den Zellen vorliegen und Translations- und Replikationsprozesse ablaufen. Im Anschluss an diese Vermehrung der viralen RNA, der Bildung neuer Virusproteine und dem Zusammenbau reifer Partikel konnten dann 10-12 h p. i. nochmals signifikant erhöhte intrazelluläre Titer bestimmt werden (Abb. 13A). Da diese Viruskonzentrationen jedoch weder der ursprüng-

lich aufgenommenen Partikelmenge (2 h p. i.) entsprachen noch diese überstiegen, kann von einer eher eingeschränkt ablaufenden Virusinfektion in murinen CD19⁺ B-Lymphozyten ausgegangen werden. Ein möglicher Grund dafür könnte z. B. die Bindung der zugesetzten Antikörper an die viralen Kapside und eine daraus resultierende begrenzte Vermehrungsfähigkeit einiger Partikel oder aber eine geringe Stoffwechselaktivität der B-Zellen sein. Ein Absinken der intrazellulären Viruskonzentrationen zwischen 11-12 h p. i. verdeutlichte schließlich ein Freisetzen der reifen Virionen ins umgebende Medium. Da auch hier bis zum Ende des untersuchten Zeitraums kein weiterer Anstieg der intrazellulären Titer zu verzeichnen war, kann davon ausgegangen werden, dass es nach dem beobachteten Replikationszyklus nicht zur Infektion neuer Zellen kommt, was vermutlich wiederum in der geringen Zahl empfänglicher CD19⁺ B-Zellen begründet liegt. Um lediglich ein Haften der Antikörper-gebundenen Viruspartikel an der Oberfläche der Zellen auszuschließen, wurden murine CD19⁺ B-Zellen in einem weiteren Versuch mit der rekombinanten Virusvariante CVB3H3/EGFP infiziert, welche ebenfalls entsprechend vorinkubiert wurde. Da dieses Virus, wie bereits erwähnt, eine leicht verzögerte Wachstumskinetik zeigt, erfolgte die Isolation des Gesamtproteins 20 h p. i. Wie Abbildung 14 darstellt, konnte auch dabei in Anwesenheit virusspezifischer Antikörper eine im Vergleich zu Kontrollkulturen gesteigerte Menge an viral gebildetem EGFP detektiert werden. Dies bestätigt nicht nur ein Eindringen der Viruspartikel in die Zellen, sondern wiederum auch eine aktive CVB3-Replikation in diesen Lymphozyten.

Vergleichende Untersuchungen zu einer Antikörper-vermittelten CVB3-Aufnahme in humane CD19⁺ B-Lymphozyten des peripheren Blutes ergaben ähnliche Ergebnisse (Abb. 15A). In Anwesenheit virusspezifischer Immunglobuline stiegen die intrazellulären Viruskonzentration 2 h p. i. ebenfalls signifikant an und sanken anschließend wiederum schnell ab. Im weiteren Verlauf der Infektion konnte dann allerdings nur zwischen 6 h und 9 h p. i. eine geringe Erhöhung der Menge infektiöser Partikel beobachtet werden, was ebenfalls auf eine stark eingeschränkte Virusvermehrung in diesen Zellen hindeutet. Wurde die Virussuspension mit humanem Kontroll-Serum ohne spezifische Antikörper vorinkubiert, zeigte sich im Gegensatz zu den murinen Zellen eine deutliche Zunahme der intrazellulären Titer zu Beginn der Infektion, wobei 4-5 h p. i. ein Maximum erreicht wurde, das jedoch immer noch weit unter dem Höchstwert der Vergleichskulturen lag. Während ein Antikörper-vermittelter Viruseintritt in humane CD19⁺ B-Lymphozyten demnach scheinbar sehr schnell nach der Infektion stattfindet und zu hohen Partikelkonzentrationen führt, findet auch unter Kontrollbedingungen eine deutliche, jedoch leicht verzögerte Aufnahme der Virionen in diese Zellen statt. Dies hat zudem zur Folge, dass der 2 h p. i. bestimmte Virustiter in mit Antikörpern-gekoppeltem CVB3 infizierten Zellen im Vergleich zu den

Kontroll-Kulturen nur etwa doppelt so hoch war (Abb. 15B). Dieser Unterschied zu murinen CD19⁺ B-Lymphozyten, welche, wie oben beschrieben, zu diesem Zeitpunkt eine deutlich größere Abweichung der Virustiter zueinander aufwiesen, könnte zum einen in der unterschiedlichen Herkunft der Zellen aus Milz bzw. peripherem Blut und einem möglicherweise damit verbundenen anderen Phenotyp begründet sein. Zum anderen wäre in Abwesenheit von spezifischen Antikörpern eine zusätzliche Aufnahme von Viruspartikeln über einzelne CAR-Moleküle möglich, da, wie unter 5.2.1 beschrieben, ein Vorhandensein dieser Rezeptoren auf humanen CD19⁺ B-Lymphozyten nicht ganz ausgeschlossen werden konnte. Letztere Hypothese wird durch zusätzliche Infektionsexperimente mit humanen Raji-Zellen unterstützt, da weder durch die Inkubation von CVB3 noch durch eine Vorbehandlung dieser Zellen mit humanem Antikörper-haltigen Serum eine verstärkte Virusaufnahme erreicht wurde (Abb. 16). Aufgrund der reichlich vorhandenen CAR-Moleküle auf deren Zelloberfläche (Abb. 12), erfolgt so vermutlich eher eine Internalisierung der Virionen über diesen Rezeptor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sowohl bei murinen als auch bei humanen CD19⁺ B-Lymphozyten in Anwesenheit eines CVB3-spezifischen Serums bereits kurz nach Infektionsbeginn zu einer schnellen Aufnahme der Virionen ins Zellinnere kommt, was signifikant erhöhte Konzentrationen infektiöser Partikel zur Folge hat. Dabei ist fraglich, inwieweit diese Virustiter (2 h p. i.) durch eine verstärkte Aufnahme von Virus in die wenigen empfängliche Zellen zustande kommen oder ob quantitativ mehr Zellen infiziert werden. Im Anschluss findet dann vor allem in murinen Zellen im Gegensatz zu Kontrollkulturen eine typische produktive Virusvermehrung statt. Da es jedoch in beiden primären Zelllinien nach einem Vermehrungszyklus über ca. 12 h nicht zur Infektion weiterer Zellen kommt, scheint nur eine begrenzte Anzahl an B-Lymphozyten suszeptibel für CVB3 zu sein. Bei humanen Raji-Zellen konnte ein solches ADE nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die in verschiedenen Studien bereits beschriebene coxsackievirale Strategie, unter normalen Umständen nur begrenzt bzw. nicht empfängliche Immunzellen über einen durch virusspezifische Antikörper vermittelten Weg zu infizieren und im Zuge dessen die Produktion verschiedener Zytokine, wie IFN- α oder Interleukin-12, auszulösen [40, 41, 140, 353]. So konnte gezeigt werden, dass die CVB4-Infektiösität für humane PBMCs und dabei insbesondere für CD14⁺ Monozyten stark erhöht war, wenn die zur Infektion verwendete Virussuspension mit einem humanen Plasma, welches virusspezifische Antikörper enthielt, vorinkubiert wurde. Dabei war die Anzahl infizierter Zellen nochmals gesteigert, wenn das Virus ausschließlich mit nicht neutralisierenden Anti-CVB4-Antikörpern behandelt wurde. Zusätzlich konnte belegt werden, dass es trotz der fehlenden Neutralisationsfähigkeit dieser Antikörper zur Bildung von Immunkomplexen mit infek-

tiösen CVB4-Partikeln kam [40, 140].

Um zu untersuchen, ob der zuvor beschriebenen Anti-Serum-vermittelten gesteigerten CVB3-Infektiosität für murine CD19⁺ B-Lymphozyten tatsächlich eine Beteiligung von Antikörpern zugrunde liegt und inwieweit dabei neutralisierende bzw. nicht neutralisierende Immunglobuline eine Rolle spielen, wurde das zur Vorinkubation verwendete Serum in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt oder mit Protein A behandelt. Wie Abbildung 17 verdeutlicht, konnte der verstärkende Effekt (2 h p. i.) des murinen Anti-Serums (1:100) durch eine zunehmende Verdünnung und eine damit einhergehende sinkende Antikörperkonzentration signifikant reduziert (1:250, 1:500) und letztlich vollkommen unterdrückt werden (1:1000). Im Gegensatz dazu hatte eine entsprechende Ausdünnung des Kontroll-Serums keinen Einfluss auf die Menge intrazellulärer Viruspartikel. Eine solche mit zunehmender Verdünnung des Anti-Serums auftretende Reduktion des verstärkten Effekts konnte auch von Girn et al. (2002) für ein ADE der Infektion von J774.1-Zellen mit CVB3 gezeigt werden [103]. Dies deutet darauf hin, dass in der Tat virusspezifische Antikörper für ein Eindringen von CVB3 in murine CD19⁺ B-Zellen von Bedeutung sein könnten. Dabei kann jedoch die Beteiligung anderer, speziell im Anti-CVB3-Serum vorhandener Komponenten nicht ausgeschlossen werden, deren Konzentration ebenfalls mit zunehmendem Verdünnungsgrad sinken würde.

Durch eine Behandlung des Serums mit Protein A war es dennoch möglich, virusspezifische Antikörper als eine Ursache für die gesteigerte CVB3-Aufnahme in diese Zellen zu identifizieren. Dieses ursprünglich aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* stammende Protein ist in der Lage, den Fc-Teil von Immunglobulinen vieler Säugetierspezies durch die Interaktion mit der schweren Kette zu binden [207]. Dabei wurde sowohl eine bevorzugte Interaktion mit IgG-Molekülen [191] als auch speziesabhängig unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen IgG-Subklassen beschrieben. So bindet Protein A mit einer starken Tendenz besonders murine IgG2a/b-Moleküle, während die Interaktion mit den Subklassen IgG1 und IgG3 eher geringer ist [35, 80]. Die vier humanen IgG-Antikörperklassen weisen dagegen mit Ausnahme von IgG3, welches nicht gebunden wird, eine sehr hohe Affinität zu Protein A auf [70]. Da durch die Zugabe dieses Proteins eine signifikante Reduktion der durch das Anti-Serum vermittelten CVB3-Infektiosität für murine CD19⁺ B-Zellen erreicht werden konnte (Abb. 18), kann davon ausgegangen werden, dass virusspezifische IgG-Antikörper an diesem viralen Penetrationsmechanismus beteiligt sind. Im Gegensatz dazu wurde die intrazelluläre Virusmenge in humanen B-Lymphozyten des peripheren Blutes durch eine Protein A-Behandlung des entsprechenden Anti-Serums nicht reduziert, sondern vielmehr zusätzlich zur bestehenden Antikörper-vermittelten Steigerung nochmals um das 4-fache erhöht (Daten nicht gezeigt). Dies weist

auf die bereits erwähnte speziesspezifische Affinität von Protein A für unterschiedliche humane IgG-Subklassen hin und lässt insbesondere auf eine Beteiligung humaner IgG3-Antikörper am ADE schließen, da deren Fc-Teile nicht oder nur geringfügig gebunden werden und diese Immunglobuline somit verfügbar vorliegen, um eine effiziente Virusaufnahme zu unterstützen. Dass eine durch virusspezifische Antikörper vermittelte Virusinfektion durch die zunehmende Verdünnung oder den Einsatz von Protein A gehemmt bzw. vollständig inhibiert werden kann, wurde auch für verschiedene Ebola-Virus-Stämme sowie für das „feline infectious peritonitis virus“ (FIPV) gezeigt [143, 319].

Um herauszufinden, inwieweit das murine verstärkende Anti-CVB3-Serum in der verwendeten Verdünnungsstufe von 1:100 eine neutralisierende Wirkung auf die eingesetzte Virusmenge hat, wurde die Konzentration noch vorhandener infektiöser Partikel für das Virus-Serum-Gemisch nach der Vorinkubation mittel TCID₅₀-Test bestimmt. Im Vergleich zu den zusätzlich angefertigten Verdünnungsstufen von 1:20 und 1:40, welche eine Reduktion der eingesetzten Virusmenge um mehr als eine log-Stufe zur Folge hatten, zeigte das Anti-Serum mit einer Verdünnung von 1:100 nur eine leicht neutralisierende Eigenschaft (Abb. 19A), die nur geringfügig stärker als die des entsprechend verdünnten murinen Kontroll-Serums war (Abb. 19B). Wurde die Konzentration des Serums, dem vorangegangenen Versuch (vgl. Abb. 17) entsprechend, noch weiter verringert, war nahezu keine Reduktion der ursprünglich eingesetzten Virusmenge mehr nachweisbar. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der durch Vorversuche erzielten Ergebnisse, die zeigten, dass Serumverdünnungen von 1:50 (Daten nicht gezeigt) und 1:250 (Abb. 17) einen deutlich geringeren penetrationsverstärkenden Effekt aufweisen als das 1:100-verdünnte Anti-Serum, dieses jedoch nur geringe neutralisierende Wirkung besitzt, kann vermutet werden, dass eher nicht neutralisierende CVB3-spezifische Antikörper für die gesteigerte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Lymphozyten verantwortlich sind. Dies würde den durch Hober et al. und Chehadeh et. al. erzielten Ergebnissen für ein ADE bei CVB4 entsprechen [40, 140]. Zudem zeigten immunhistochemische APAAP-Untersuchungen an CVB3-infizierten GMK-Zellen und unter Verwendung der verschiedenen Serumverdünnungen, dass trotz des geringen Anteils an neutralisierenden Immunglobulinen im 1:100-verdünnten Anti-Serum eine intensive Erkennung coxsackieviraler Antigene durch virus-spezifische Antikörper stattfindet (Abb. 20C). Auch mit der Verdünnungsstufe 1:250, welche, wie zuvor beschrieben, noch eine geringe Aktivität besitzt, die Infektion muriner B-Zellen zu verstärken, war es möglich, Virusantigene zu detektieren (Abb. 20D). Im Gegensatz dazu zeigten das Anti-Serum in höheren Verdünnungen (1:500/1:1000) sowie das Kontroll-Serum (1:20) nur geringfügige bzw. keinerlei Antigenbindungseigenschaft (Abb. 20E-G). Dies bestätigt im weitesten Sinne die von Chehadeh et al. beschriebenen

Ergebnisse zur Bildung von Immunkomplexen aus nicht neutralisierenden Antikörpern und CVB4. So wurden die in einem humanen Anti-Serum enthaltenen Immunglobuline zunächst mittels Protein A-Affinitätschromatographie isoliert und zusätzlich über eine CVB4-spezifische Sepharose-Säule aufgetrennt. Anschließend war es möglich, sowohl mit der gebundenen Fraktion als auch durch eine entsprechende Inkubation von CVB4 mit den Antikörpern des Durchflusses eine Immunkomplex-Bildung nachzuweisen, die zudem abhängig von der Antikörperkonzentration war. Ausschließlich mit nicht neutralisierenden Immunglobulinen komplexierte Viruspartikel waren dann in der Lage, eine ADE-abhängige IFN- α -Produktion humaner PBMCs zu induzieren [40].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in Anwesenheit eines Anti-Serums gesteigerte Infektiosität von CVB3 für murine CD19⁺ B-Lymphozyten durch virusspezifische Antikörper vermittelt wird, die zwar die Fähigkeit besitzen, Virusantigene zu erkennen und an diese zu binden, jedoch nur eine geringe neutralisierende Wirkung haben. Zudem darf gleichzeitig nur eine sehr geringe Konzentration an neutralisierenden Antikörpern vorhanden sein. Da die Wahrscheinlichkeit einer natürlichen humanen Infektion mit einem CV der Gruppe B vergleichsweise hoch ist und es zudem dabei sowohl zur Bildung serotypspezifischer als auch zu der gruppenspezifischer Antikörper kommt, die nicht zu einer Virusneutralisation führen [92, 96], wäre ein verstärkter Viruseintritt in B-Zellen des peripheren Blutes durch diese Immunglobuline bei einer Neuinfektion mit einem hetero- oder homologen CVB, noch vor der Produktion neutralisierender Antikörper durch das Immunsystem, und damit eine schnelle Virusverteilung durchaus denkbar.

5.2.3 Bedeutung zellulärer Fc γ -Rezeptoren

Bei einer Vielzahl von Viren ist es möglich, die beobachtete Verstärkung der Infektion für verschiedene Zielzellen durch Antikörper zu blockieren, welche gegen einen oder mehrere zelluläre Fc γ R auf der Zelloberfläche gerichtet sind. Zum ersten Mal wurde dies durch Peiris et al. für das West-Nil-Virus gezeigt [258, 259]. Aber auch die Infektion Makrophagen-ähnlicher Zelllinien mit dem Gelbfieber-Virus oder Dengue-Viren konnte durch eine Vorbehandlung mit anti-Fc γ R-Antikörpern inhibiert werden [61, 280, 281]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde dann der bereits unter 5.2.2 beschriebene Fc γ R-abhängige ADE-Mechanismus identifiziert und später für weitere Viren belegt. Nach einer, durch die Bindung verstärkender Antikörper an geeignete virale Epitope gekennzeichneten, Immunkomplexbildung kann es zur Interaktion zwischen zellulären Fc γ R und dem Fc-Teil der Immunglobuline kommen [101]. So ist auch an Antikörper gebundenes Poliovirus in der Lage, humane PBMCs über einen Fc γ R zu infizieren und dadurch eine gesteigerte IFN- α -Produktion zu induzieren [257]. Hober et al. verwendeten bei den bereits erwähnten Stu-

dien zum ADE bei CVB4 verschiedene monoklonale Antikörper für drei FcγR-Klassen: hoch affine FcγRI (CD64) sowie niedrig affine FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16). Dabei konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Antikörper gegen FcγRII und FcγRIII zu einer Reduktion der Anzahl infizierter Zellen führten, während ein Anti-FcγRI-Antikörper keinen Effekt hatte. Dies ließ demnach auf eine Beteiligung dieser beiden Rezeptoren an der Antikörper-vermittelten CVB4-Infektion humaner CD14⁺ Monozyten schließen [140].

Um zu untersuchen, ob und inwieweit auch das durch eigene Experimente belegte ADE bei der Infektion primärer muriner CD19⁺ B-Lymphozyten durch eine Interaktion Antikörper-gebundener CVB3-Partikel mit zellulären FcγR zustande kommt, wurden ebenfalls Blockierungsexperimente durchgeführt. Der einzige klassische Antikörper-bindende FcγR auf murinen und humanen B-Zellen ist das CD32(FcγRII)-Molekül, welches im Normalfall für die Regulation aktivierender Signale verantwortlich ist, die über Dendritische Zellen an den B-Zell-Rezeptor weitergeleitet werden [246]. Dies entscheidet dann über eine mögliche Proliferation der Zellen, über den Wechsel zur Produktion einer anderen Antikörperklasse oder über eine Reifung zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen. Werden FcγRII und B-Zell-Rezeptor gleichzeitig besetzt, wird Apoptose induziert, was einen weiteren Mechanismus zur Kontrolle der B-Zell-Antwort darstellt [246].

Für eine Blockierung des murinen CD32-Moleküls auf CD19⁺ B-Lymphozyten wurden diese Zellen mit einem Antikörper vorinkubiert, welcher sowohl gegen CD32 als auch gegen CD16 (FcγRIII) gerichtet war. Durch eine Kopplung an das grün-fluoreszierende Protein FITC war es sehr einfach möglich, die Bindung dieses Antikörpers an die FcγRII-Moleküle auf der B-Zelloberfläche nachzuweisen. Abbildung 21 zeigt, dass nach einer Inkubation mit diesem Antikörper nahezu jede Zelle von einem deutlich sichtbaren grünen Schein umgeben war, was nicht nur auf ein zahlreiches Vorhandensein von FcγR auf CD19⁺ B-Lymphozyten schließen lässt, sondern auch eine gute Bindungseigenschaft dieses Immunglobulins für die entsprechenden Epitope widerspiegelte. Um zu untersuchen, ob die zuvor dargestellte gesteigerte Aufnahme Antikörper-gebundener CVB3-Partikel in murine B-Zellen über eine Bindung der Immunkomplexe an CD32-Moleküle vermittelt wird, wurden die mit zunehmender Konzentration an anti-FcγRII/FcγRIII-Immunglobulinen behandelten Zellen mit einer Anti- bzw. Kontroll-Serum-vorinkubierten Virussuspension infiziert. Während eine Blockierung von CD32 keinen Einfluss auf die intrazellulären Partikelmen-gen der Kontrollkulturen hatte, wurde der Eintritt von CVB3-Immunkomplexen überraschenderweise mit zunehmender anti-FcγRII/FcγRIII-Antikörperkonzentration begünstigt (Abb. 22). Dabei waren die intrazellulären Virustiter 2 h p. i. im Vergleich zu unbehandelten Zellen um das 2-4-fache signifikant gesteigert. Auch in diesem Fall konnte diese Beo-

bachtung durch eine Infektion mit CVB3H3/EGFP, welches ebenfalls zuvor mit Anti-Serum vorinkubiert wurde, bestätigt werden. Die anschließende EGFP-Western Blot-Analyse zeigte ein sich mit zunehmender Antikörpermenge intensivierendes spezifisches Signal (Abb. 23). Dies lässt darauf schließen, dass die opsonierten Viruspartikel in der Lage sind, murine CD19⁺ B-Lymphozyten scheinbar FcγR-unabhängig zu infizieren und im Inneren der Zellen zu replizieren. Dabei kann jedoch eine unvollständige Blockierung der zellulären FcγR durch den verwendeten anti-CD32/CD16-Antikörper besonders in funktioneller Hinsicht nicht ausgeschlossen werden, was ein noch effizienteres Eintreten der Viruspartikel über nicht oder unzureichend besetzte FcγR zur Folge hätte und als eine mögliche Ursache für die deutlich gesteigerten intrazellulären Viruskonzentrationen in Betracht gezogen werden kann. Um die vorliegende Datenlage zu überprüfen, wurde den B-Zellen vor der Infektion anstelle der anti-FcγRII/FcγRIII-Immunglobuline ein kommerzielles FcR-Blockierungsreagenz zugesetzt, welches üblicherweise während einer magnetischen Separation sehr seltener Zellpopulationen eingesetzt wird. Da es sich bei diesem Gemisch um eine Vielzahl verschiedener muriner Immunglobuline handelt, werden den Herstellerangaben zufolge alle Fc-Bindestellen auf FcγR-tragenden Zellen effizient blockiert. Wie Abbildung 24 zeigt, wurde dieses Reagenz in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, wobei das Verhältnis 1:10 der empfohlenen Menge entspricht. Eine höhere Konzentration an FcR-Blockierungsreagenz (1:5) diente zusätzlich zur Absicherung des Ergebnisses. Wurden die murinen B-Zellen anschließend mit Kontroll-Serumvorinkubierter Virussuspension infiziert, war keine nennenswerte Steigerung der intrazellulären CVB3-Titer (2 h p. i.) nachweisbar. Im Gegensatz dazu und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen FcγR-Blockierungsexperimenten, wurde die Virusaufnahme in Anwesenheit virusspezifischer Antikörper mit zunehmender Reagenzkonzentration begünstigt.

Entgegen dem bis dato für verschiedene Picornaviren und speziell auch für CVB3 beschriebenen ADE-Mechanismus zur Infektion von Immunzellen über die zellulären FcγR, kann zusammenfassend festgestellt werden, dass CVB3 murine CD19⁺ B-Lymphozyten vermutlich über einen Antikörper-vermittelten jedoch FcγR-unabhängigen Weg infiziert. Da in beiden FcR-Blockierungsversuchen kein Einfluss auf die nicht durch Antikörper vermittelte Virusaufnahme in Kontrollkulturen beobachtet werden konnte, scheint auch dieser noch unbekannte coxsackievirale Infektionsweg nicht abhängig von der Funktion zellulärer FcγR abhängig zu sein.

5.2.4. Bedeutung des Komplementsystems

In weiterführenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass ein Erhitzen (30 min, 56 °C) des zur Virusvorinkubation verwendeten Anti-CVB3-Serums einen hemmenden Einfluss auf die Aufnahme von Virionen in murine CD19⁺ B-Lymphozyten hat (Abb. 25). In diesem Fall war die unter normalen Bedingungen gesteigerte intrazelluläre Viruskonzentration um 45 % reduziert. Dem entgegen beeinträchtigte eine entsprechende Behandlung des Kontroll-Serums den Antikörper-unabhängigen Viruseintritt nicht. Diese Beobachtung konnte zudem auch für B-Zellen bestätigt werden, die nicht nur aus unbehandelten, sondern vielmehr aus CVB3-infizierten Versuchstieren stammten (Tab. 8 und Abb. 32). Dabei verhinderte ein in gleicher Weise durchgeführtes Erhitzen den verstärkenden Effekt des Anti-CVB3-Serums sogar vollständig und die intrazellulären Virustiter waren in etwa so hoch wie die Partikel-Konzentration in B-Lymphozyten, welche mit einer unbehandelten Virus-suspension infiziert wurden. Eine Ursache für diesen Effekt könnte zum einen die Zerstörung von Immunglobulinen sein, welche, wie zuvor beschrieben, essentiell für eine verstärkte Virusaufnahme sind. Zum anderen könnte diese Beobachtung ein Hinweis auf die Beteiligung des Komplement-Systems am beschriebenen ADE-Mechanismus sein, da diese Art des Erhitzens als klassische Komplement-Inaktivierungsmethode gilt. Dass eine entsprechende Wärmebehandlung zu einer Reduktion der durch Antikörper vermittelten Infektiosität eines Virus führen kann, wurde in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen bereits von Takada et al. für Ebolavirus gezeigt [319].

Um einem möglichen Komplement-abhängigen ADE nachzugehen, sollte zunächst untersucht werden, ob und inwieweit eine Komplement-Aktivierung bei der beobachteten verstärkten Aufnahme Antikörper-gebundener CVB3-Partikel in CD19⁺ B-Lymphozyten eine Rolle spielt. Die Komplement-Initiation über den klassischen Weg wird über die Bindung von Immunkomplexen an den Komplement-Komplex C1 und insbesondere an die Komponente C1q vermittelt, was eine Konformationsänderung in diesem Molekül zur Folge hat [48]. Weiterer Bestandteil dieses Komplexes ist ein Tetramer aus je zwei Molekülen der Serinproteasen C1s und C1r, die nach eigener Spaltung eine kaskadenartige Prozessierung verschiedener Komplement-Komponenten (C4, C2, C3, C5) und die damit einhergehende Bildung der zwei wichtigen Komplement-Konvertasen auslösen. Alternativer und Lektin-Weg der Aktivierung sind dagegen Antikörper- und C1q-unabhängig, münden jedoch wie der klassische Weg auch in einer terminalen Komplement-Kaskade, die zur Bildung eines so genannten Membranangriffs-Komplexes und schließlich zu einer Zelllyse führt [350, 351]. Da die Aktivität bestimmter Komplement-Komponenten abhängig von der Anwesenheit verschiedener Ionen ist [201], kann durch den Einsatz von Chelatoren eine selektivere Inhibierung dieser Wege erreicht werden [200]. Diese Substanzen bilden mit

Kationen stabile Komplexverbindungen und bewirken so eine Depletion dieser Ionen [89]. Durch eine solche Beseitigung betroffen sind u. a. die Ca^{2+} -abhängige Komponente C1q des klassischen Wegs [73] und der für den alternativen Initiationsprozess wichtige Faktor D, welcher in Abwesenheit von Mg^{2+} inaktiv ist [238]. In der vorliegenden Arbeit wurde den für die Virusvorinkubation verwendeten murinen Seren einer von zwei verschiedenen Chelatbildnern beigelegt, wobei die eingesetzte Endkonzentration von 10 mM der in verschiedenen Studien beschriebenen entsprach [63, 89]. Der Einsatz von EDTA, welches Ca^{2+} und Mg^{2+} komplexiert, verhinderte dabei sowohl eine Komplement-Aktivierung über den klassischen als auch über den alternativen Weg, hatte jedoch keinen Einfluss auf die verstärkte Antikörper-vermittelte Aufnahme von CVB3 in murine CD19^+ B-Lymphozyten (Abb. 26). Eine Bindung von Ca^{2+} im Anti-CVB3-Serum und damit eine Hemmung der klassischen Komplement-Aktivierung wurden durch EGTA erreicht. Um einen uneingeschränkten Verlauf des alternativen Wegs zu gewährleisten, erfolgte in einigen Fällen außerdem die Zugabe von Mg^{2+} , was, wie Abbildung 26 zeigt, im Vergleich zu EDTA und EGTA die stärkste Wirkung auf die Aufnahme von Antikörper-gebundenem CVB3 in die B-Zellen hatte. Diese Reduktion der intrazellulären Virustiter (2 h p. i.) betrug jedoch nur etwa 23 % und lässt somit keine eindeutigen Schlüsse auf die Beteiligung einer Aktivierung der Komplementkaskaden zu. Lediglich gibt diese Beobachtung einen Hinweis darauf, dass bestimmte Komponenten des klassischen Initiationsweges eine Antikörper-abhängige CVB3-Aufnahme begünstigen oder vermitteln könnten. Ein möglicher Mechanismus, der unabhängig von zellulären $\text{Fc}\gamma\text{R}$ oder der Induktion einer Komplementkaskade ein ADE ermöglicht wurde 2001/2003 von Takada et al. für das Ebola-Virus beschrieben [317, 319]. Dabei konnte ebenfalls eine durch Verdünnen des Anti-Serums und Behandlung mit Protein A die Beteiligung von Antikörpern an der gesteigerten Infektiosität verschiedener Virusstämme belegt werden. Durch ein Erhitzen ging die verstärkende Wirkung des Anti-Serums ebenfalls verloren; die Zugabe von EGTA hatte jedoch keinen inhibitorischen Einfluss, sondern erhöhte vielmehr den Prozentsatz infizierter Zellen. Durch den Einsatz eines Antikörpers gegen die Komplement-Komponente C1q und die daraus folgende Reduktion der Immunglobulin-vermittelten Infektiosität des Ebola-Virus, konnte später nachgewiesen werden, dass dieser hitzelabile Serum-Faktor verantwortlich für das beobachtete ADE ist. Dieses Molekül ist zudem in der Lage, die Fc-Teile von Antikörpern zu binden und direkt mit zellulären C1q-bindenden Proteinen oder -Rezeptoren zu interagieren [73]. Takada et al. konnten weiterhin zeigen, dass dabei eine effektivere Infektion der Zellen erfolgte, wenn C1q frei vorlag und nicht in Form des Komplement-Komplexes C1 gebunden an C1s und C1r vorlag. Die Dissoziation der Komponenten kann zum einen durch einen Mangel an Ca^{2+} oder aber durch im Plasma enthaltenen C1-Inhibitor erreicht

werden, wenn C1q an einen Aktivator, d. h. ein Antikörper-gebundenes Pathogen bindet. Da auch in der vorliegenden Arbeit eine Hitzeinaktivierung des Anti-CVB3-Serums zur Reduktion der infektionsverstärkenden Wirkung führte, zelluläre FcγR vermutlich nicht an diesem Prozess beteiligt sind, der Einsatz von Chelatbildnern keine eindeutige Aussage über eine Komplementaktivierung zuließ und B-Zellen verschiedene C1q-Rezeptoren (z. B. CR1) besitzen, könnte das bei der Infektion muriner CD19⁺ B-Lymphozyten beobachtete ADE ebenfalls durch diese Komplement-Komponente vermittelt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, bedarf es jedoch weiterführenden Untersuchungen.

5.3 CVB3-Infektion muriner CD19⁺ B-Zellen *in vivo*

5.3.1 Anteil empfänglicher CD19⁺ B-Zellen im murinen Milzgewebe

Um die Bedeutung muriner CD19⁺ B-Lymphozyten während einer akuten CVB3-Infektion *in vivo* und dabei im Speziellen die Infektion dieser Zellen selbst näher zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente mit männlichen BALB/c-Mäuse durchgeführt. Nach einer i. p. Inokulation mit CVB3 konnte bereits 2 Tage p. i., während der akuten Phase der Infektion, mittels immunhistochemischer Analyse und spezifischer RT-PCR die Einwanderung CD19⁺ Zellen in das Pankreasgewebe nachgewiesen werden, welches das erste Zielorgan für die virale Replikation darstellt (Abb. 27). Fünf Tage später werden auch in das infizierte Myokard verstärkt CD19⁺ B-Zellen rekrutiert. Im Milzgewebe, dessen Follikel auch in unbehandelten Tieren eine hohe Zahl an CD19⁺ B-Zellen enthalten, führte die Infektion mit CVB3 zu einer deutlichen Proliferation dieser Zellen in den sekundären Keimzentren der weißen Pulpa. Diese starke Zunahme der Milz-B-Lymphozytenzahl infolge einer CVB3-Infektion konnte auch in einer Studie von Mena et al. nachgewiesen werden [232]. Die Funktion dieser B-Lymphozyten besteht dabei zum einen schon während der frühen Virämie in der Produktion neutralisierender Antikörper, die eine Bedeutung für die Beseitigung freier Virionen haben [44]. Zum anderen sind diese Zellen als Produzenten virusspezifischer Antikörper in der späteren subakuten Phase in Ergänzung zur Rekrutierung CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ CTL unerlässlich bei der Bekämpfung der Virusinfektion über den humoralen Zweig der Immunantwort [332].

Um herauszufinden, ob und in welchem Umfang diese CD19⁺ B-Lymphozyten des murinen Milzgewebes auch nach einer *In vivo*-Infektion für CVB3 empfänglich sind, wurde das Milzgewebe infizierter BALB/c-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten p. i. entnommen und anschließend erfolgte eine CD19-spezifische Isolation von B-Zellen. Wie Abbildung 28A zeigt, konnte CVB3 bereits einen Tag p. i. mittels virusspezifischer PCR in den CD19⁺ Lymphozyten detektiert werden, obgleich der Nachweis einer infektiöser Partikel zu diesem Zeitpunkt nicht erbracht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich des bereits

durch die PCR-Reaktion amplifizierten und dennoch sehr schwachen Signals ist davon auszugehen, dass 24 h p. i. eine extrem geringe Anzahl an virus-positiven B-Zellen im murinen Milzgewebe vorliegt. Eine Produktion infektiöser Viruspartikel konnte dabei nicht bestätigt aber auch nicht ausgeschlossen werden, da die ICA-Methode für die Detektion einer so geringen Menge an infizierten Lymphozyten vermutlich nicht ausreichend sensitiv ist. An den Tagen 3 und 4 nach der Infektion konnte das Virus dann deutlich mittels VP1-spezifischer PCR in der CD19⁺ B-Zellpopulation nachgewiesen werden, wobei 3 d p. i. nur etwa 0,2-0,3 % und 4 d p. i. noch weniger B-Lymphozyten im ICA eine Plaquebildung verursachten (Abb. 28C). Zum einen wurde dadurch klar, dass 3 d nach der Infektion die maximale Zahl CD19⁺ B-Lymphozyten infiziert ist, zum anderen weist die Bildung von Plaques auf eine mögliche produktive Infektion und damit auf eine aktive Replikation von CVB3 in diesen Zellen hin.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde die isolierte RNA zusätzlich unter Verwendung von zwei Primern (EV1/EV2), die als strangspezifisch an virale Positiv- bzw. Negativ-RNA-Stränge bindend beschrieben wurden [346] in cDNA umgeschrieben, so dass eine anschließende PCR mit beiden Oligonukleotiden entweder virale Plus- oder Minus-Stränge amplifizierte. Dabei konnte bei B-Zellen aus infizierten Tieren Virus-RNA beider Orientierungen detektiert werden, wobei deutlich weniger Negativ-Stränge vorlagen (Abb. 28B). Dies bestätigte zusätzlich eine quantitative Analyse der cDNA mittels real time-PCR. Das Auftreten von Minus-Strängen sowie das ermittelte Verhältnis dieser zu viralen RNA-Genomen (1:21) deuteten auf eine aktive Vermehrung von CVB3 in CD19⁺ B-Zellen hin, da es zum einen unter normalen Umständen im Zuge der Virusreplikation zur Bildung von Negativ-Strängen kommt und zum anderen anschließend an einem solchen mehrere neue Positiv-Stränge synthetisiert werden [249]. Zusätzlich müssen jedoch neuere Studien von Kim et al. (2005/2008) bei der Detektion coxsackieviraler Minus-RNA berücksichtigt werden, in denen gezeigt wurde, dass es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am 5'-Ende der viralen RNA zu unterschiedlich langen Deletionen kommen kann, infolge derer auch 5'-trunkierte Minus-Strang-RNA-Moleküle in virale Kapside verpackt werden, die mitunter infektiös sind [179, 180]. Somit kann aufgrund der mittels PCR und ICA erzielten Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Resultate aus den oben beschriebenen (5.1) *In vitro*-Infektionsexperimenten zwar von einer aktiven CVB3-Replikation in murinen CD19⁺ B-Lymphozyten der Milz ausgegangen werden, eine falsch positive Detektion viraler trunkierter Negativ-Stränge kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, zumal die für die strangspezifische RT-PCR verwendeten Primer im mittleren Bereich der 5'-NTR binden und Kim et al. belegen konnten, dass die maximale Ausdehnung der 5'-terminalen Deletionen etwa 49-50 bp umfasst [179]. Aufgrund dessen würde im Zuge der verwen-

ten strangspezifischen RT-PCR eine solche Deletion und damit auch das Vorhandensein Kapsid-umhüllter Negativ-RNA unerkannt bleiben. Zudem kann auch, wie bereits zu Beginn beschrieben, durch die ICA-Methode keine eindeutige und zweifelsfreie Aussage über eine aktive Vermehrung von CVB3 in CD19⁺ B-Lymphozyten getroffen werden. In Kombination mit dem Nachweis einer Replikation in diesen Zellen unter *In vitro*-Bedingungen (5.1) kann jedoch eine solche angenommen werden. Bei genauerer Untersuchung der Sensitivität eines ICA zeigte sich zudem, dass der durch diese Methode ermittelte Prozentsatz an infizierten B-Zellen in etwa um das dreifache zu niedrig bestimmt wird (Abb. 29). Demzufolge ist davon auszugehen, dass 3 d p. i. etwa 0,6-1 % CD19⁺ B-Lymphozyten des murinen Milzgewebes infiziert sind. Dies bestätigt zum einen die bereits durch die vorangegangenen *In vitro*-Infektionsexperimente entstandene Vermutung, dass nur ein sehr geringer Anteil an B-Lymphozyten der Milz empfänglich für CVB3 ist. Zum anderen entsprechen diese Ergebnisse denen einer Studie von Mena et al. (1999), wobei für CD45R/B220⁺ Milz-B-Zellen immunkompetenter C57BL/6-Mäuse unter Verwendung von ICA eine Infektion durch CVB3 belegt werden konnte [232]. Zudem wurde ebenfalls 3 d nach einer i. p. Virusinokulation ein Maximum an infizierten B-Lymphozyten von 1-10 % erreicht, was jedoch nicht zu einer Reduktion der B-Zellzahl führte. Der im Vergleich zu den eigenen Daten höhere Maximalwert könnte zum einen im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der eingesetzten Mausstämme oder auch in einer abweichenden Zusammensetzung des für ICA verwendeten „overlay“ begründet liegen. Eigene Experimente zeigten, dass ein höherer Anteil an Agar einen größeren Teil der überschichteten B-Zellen schnell einschließt und dadurch eine Freisetzung der potentiell enthaltenen Viruspartikel hemmt (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Grund für den höheren Anteil infizierter Zellen könnte auch die bereits unter 5.2.1 erwähnte „Verunreinigung“ der isolierten Lymphozytensuspensionen mit CVB3-empfindlichen Nicht-B-Zellen sein.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass es infolge einer CVB3-Infektion nicht nur zu einer starken Proliferation von CD19⁺ B-Lymphozyten im murinen Milzgewebe kommt, sondern dass auch ein geringer Prozentsatz dieser Zellen selbst durch das Virus infiziert wird, wobei vermutlich eine aktive und produktive virale Replikation stattfindet. Fraglich bleibt dabei jedoch, ob der geringe Anteil empfindlicher B-Lymphozyten eine bestimmte Population an Zellen darstellt, inwieweit spezielle Oberflächenstrukturen eine selektive Komponente darstellen oder ob nur B-Lymphozyten in einem bestimmten Aktivierungszustand eine coxsackievirale Replikation ermöglichen.

5.3.2 CVB3-spezifische Antikörper *in vivo*

Basierend auf den unter 5.2.2 beschriebenen *In vitro*-Ergebnissen zur gesteigerten Antikörper-vermittelten Aufnahme von CVB3 in CD19⁺ B-Zellen aus murinem Milzgewebe sollte untersucht werden, inwieweit der Anteil infizierter B-Lymphozyten während einer Infektion immunkompetenter Mäuse durch bereits vorhandene virusspezifische Immunglobuline beeinflusst wird. Dazu wurde ein *In vivo*-Infektionsexperiment durchgeführt, bei dem das inokulierte Virus auf zweierlei Weise in Kontakt mit virusspezifischen Antikörpern gebracht wurde (Tab. 7). Zum einen erfolgte eine natürliche Induktion solcher Immunglobuline im Versuchstier selbst, indem eine im verwendeten Mausmodell wenig virulente CVB3-Variante (CVB3M2) [206] im Abstand von 14 d zwei Mal inokuliert wurde (Inokulationsgruppe 4 und 5), was in allen Individuen nachweislich zu einer Antikörperbildung führte. Anschließend wurde eine der beiden Gruppen mit dem hoch letalen CVB3-Stamm H3 infiziert [190]. Zum anderen erfolgte in Anlehnung an die *In vitro*-Experimente bei einer weiteren Gruppe von Versuchstieren (Inokulationsgruppe 3) vor der Infektion mit CVB3H3 eine Inkubation der Virussuspension mit verdünntem murinen Anti-Serum.

Drei Tage p. i. wiesen die Tiere, bei denen vor der „challenge“-Infektion mit CVB3H3 eine Antikörperbildung induziert wurde, keine äußerlichen Krankheitszeichen auf und ein Virusnachweis in den Zielorganen Pankreas, Milz und Herz war mittels TCID₅₀-Test nicht möglich. Zudem ergaben auch die mit CD19⁺ B-Lymphozyten der Milzgewebe durchgeführten ICA keinerlei Hinweis auf eine Infektion dieser Immunzellen. Eine zusätzliche Amplifikation viraler Genome mit Hilfe einer real time-PCR verlief ebenfalls negativ. Dies deutet darauf hin, dass die Menge an induzierten neutralisierenden Antikörpern ausreichend war, um die Tiere vollständig vor einer Infektion mit dem „challenge“-Virus zu schützen, was die bereits in der Literatur beschriebene Bedeutung von B-Zellen und der durch diese gebildeten virusspezifischen Antikörper bestätigt und unterstreicht [44, 332]. Da demnach der Anteil neutralisierender Immunglobuline im Blut dieser Tiere hoch gewesen sein musste, konnte ein eventuell auch unter *In vivo*-Bedingungen stattfindender verstärkter durch nicht neutralisierende Antikörper vermittelter Eintritt von CVB3 in CD19⁺ B-Zellen der Milz bzw. ein möglicherweise erhöhter Anteil an infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. In zukünftigen Experimenten müsste die Konzentration CVB3-neutralisierender Antikörper im Blut der Tiere geringer sein, um entsprechende Untersuchungen durchführen zu können. Erreicht werden könnte dies z. B. durch eine i. v. Applikation eines stark verdünnten murinen Anti-Serums oder durch eine Infektion der Tiere mit einem anderen CVB-Serotyp, da es infolgedessen zur Bildung gruppenspezifischer nicht neutralisierender Immunglobuline kommt [92]. Dass eine solche Primärinfektion mit einem anderen CVB-Serotyp (CVB2) einen negativen Effekt auf den Verlauf einer CVB3-

Sekundärinfektion hat, konnte 1990 durch eine Studie von Beck et al. gezeigt werden. Dabei entwickelten die so infizierten Versuchstiere eine schwerwiegendere Entzündung des Herzmuskels als Mäuse, die ausschließlich eines der beiden heterologen Viren erhalten hatten [16]. Girn et al. vermuteten später nach weiterführenden Untersuchungen mit A/J-Mäusen, denen CVB3 zusammen mit gereinigten Anti-CVB2-Antikörpern verabreicht wurde, eine Beteiligung dieser kreuzreaktiven, nicht neutralisierenden Immunglobuline als mögliche Ursache für die durch Beck et al. beschriebene Verstärkung der Zweitinfektion [103]. Auch in den diesen Mäusen konnte eine deutlich erhöhte Viruslast in Serum, Pankreas, Herz und Milz sowie eine massive Zerstörung der Gewebe festgestellt werden. Eine Beteiligung von B-Zellen wurde dabei allerdings nicht untersucht, wäre jedoch aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Infektion CD19⁺ B-Lymphozyten ein interessanter Aspekt. Die erhöhte Viruslast der einzelnen Organe könnte dabei durch eine frühzeitige, über einen Antikörper-abhängigen Mechanismus vermittelte, Infektion von B-Zellen und eine dementsprechend schnellere bzw. effizientere Verteilung von CVB3 im Wirt zustande kommen.

Wie Abbildung 31 zeigt, konnte auch durch eine Vorinkubation von CVB3H3 mit dem murinen Anti-Serum keine Erhöhung des Anteils infizierter CD19⁺ Milz-B-Zellen erreicht werden und die Menge an viralen Genomen in diesen Zellen war ähnlich der in B-Lymphozyten CVB3H3-infizierter Tiere der Inokulationsgruppe 2. Auch hatte diese Virus-Opsonierung keinen positiven, sondern eher einen negativen Einfluss auf die Virusmenge im Serum sowie in Pankreas- und Milzgewebe (Abb. 30 A/B/D). Vermutlich wurden die an Antikörper-gekoppelten Viruspartikel dabei schneller und effizienter durch das Wirtsimmunsystem erkannt und effektiv beseitigt. Im Kontrast stehen jedoch, verglichen mit der infizierten Kontrollgruppe 2, zum einen deutlich erhöhte Mengen an infektiösem Virus im Myokard und zum anderen ein schwerer Krankheitszustand dieser Tiere. Dies deutet darauf hin, dass vorhandene virusspezifische, nicht neutralisierende Antikörper auch hier einen negativen Effekt auf die Pathogenese der CVB3-Infektion hatten. Für eine genauere Analyse der zugrunde liegenden Vorgänge und Mechanismen sind jedoch weiterführende Experimente notwendig. Aus diesem und den vorangegangenen *In vivo*-Infektionsversuchen kann jedoch auch geschlossen werden, dass eine erhöhte bzw. verringerte injizierte Dosis an CVB3 den Anteil infizierter CD19⁺ B-Lymphozyten in der Milz nicht beeinflusst, da den Mäusen in beiden Fällen sehr unterschiedliche Virusmengen verabreicht wurden.

5.3.3 Einfluss des Zellaktivierungsstatus auf die Infektion CD19⁺ B-Zellen mit CVB3

Zusätzlich zu den oben beschriebenen untersuchten Parametern wurden die aus Milzgewebsproben der jeweiligen Inokulationsgruppen isolierten CD19⁺ B-Lymphozyten auf ihr Verhalten hin getestet, unbehandeltes CVB3 bzw. opsoniertes Virus aufzunehmen. Dabei zeigten sich, wie Abbildung 32 darstellt, überraschenderweise deutliche Unterschiede zwischen den B-Lymphozyten verschiedener Versuchsgruppen. Eine *In vitro*-Infektion mit unbehandeltem CVB3 führte 2 h p. i. in Zellen aus CVB3H3- und CVB3H3(opsoniert)-infizierten Tieren (Gruppen 2/3) im Vergleich zu Zellen aus den anderen Gruppen zu deutlich höheren intrazellulären Virustitern. Wurde für die *In vitro*-Infektion jedoch eine mit Anti-CVB3-Antikörpern vorinkubierte Virussuspension verwendet, waren es vor allem B-Lymphozyten aus Versuchstieren, welche nach zweifacher CVB3M2-Injektion zusätzlich CVB3H3 (Gruppe 5) erhalten hatten, die im Vergleich zu Zellen aus Kontrollmäusen signifikant erhöhte intrazelluläre Partikelkonzentrationen aufwiesen. Aber auch B-Lymphozyten aus den Inokulationsgruppen 2 und 3 (CVB3H3 und CVB3H3-opsoniert) enthielten dabei im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte Virusmengen. Wurde das verwendete Anti-CVB3-Serum erhitzt und erst dann mit der Virussuspension vorinkubiert, waren es wiederum B-Lymphozyten aus diesen 3 Gruppen, die im Vergleich zu Zellen aus Kontrolltieren signifikant erhöhte intrazelluläre Viruskonzentrationen aufwiesen. Demzufolge versetzt scheinbar ein vorausgegangener *In vivo*-Kontakt mit CVB3 CD19⁺ B-Lymphozyten der Milz in einen Zustand, der eine Virusaufnahme im Falle einer sekundären Infektion erleichtert. Da die aus lediglich mit CVB3M2 infizierten Tieren stammenden Zellen ein solches Verhalten nicht zeigten, war demnach bei B-Lymphozyten der Inokulationsgruppe 5 (CVB3M2+CVB3H3) wiederum die Infektion mit CVB3H3 entscheidend.

Die erhöhten intrazellulären Titer in Zellen aus CVB3H3- und CVB3H3(opsoniert)-infizierten Mäusen (Gruppen 2/3) könnten dabei zum Teil auf die *In vivo*-Infektion selbst zurückzuführen sein, da diese Zellen, wie zuvor beschrieben (Abb. 31), bereits infektiöse Partikel enthielten. In allen drei Fällen und vor allem bei ursprünglich virusfreien B-Lymphozyten aus Mäusen der Gruppe 5 könnte jedoch auch ein gewisser Aktivierungszustand der Zellen durch den *in vivo* stattgefundenen Kontakt mit CVB3H3 und eine daraus folgende erhöhte Empfänglichkeit für das Virus ein mögliche Ursache sein. Unterstützt wird diese Vermutung auch bei näherer Betrachtung der Anti-Serum-abhängigen Viruskonzentrationssteigerung in B-Lymphozyten der unterschiedlichen Inokulationsgruppen. Tabelle 8A zeigt, dass Antikörper-gebundene Viruspartikel am effektivsten durch CD19⁺ B-Zellen der Gruppe 5 (CVB3M2+CVB3H3) aufgenommen wurden. Zwar war auch bei Lymphozyten aus den restlichen Gruppen eine verstärkte Aufnahme opsonierter Virionen zu verzeichnen, aber eine solche ca. 17-fach gesteigerte intrazelluläre Virusmenge

wurde nicht annähernd erreicht. Dieser starke Unterschied vor allem im Vergleich zu B-Zellen der Gruppen 2 (CVB3H3), 3 (CVB3H3 opsoniert) und 4 (CVB3M2), welche ebenfalls aus infizierten Tieren isoliert wurden, könnte auf eine effektivere bzw. schnellere Aktivierung dieser Immunzellen unter *In vivo*-Bedingungen zurückzuführen sein. Da das Wirtsimmunsystem bereits durch die CVB3M2-Primärinfektion in Kontakt mit coxsackieviralen Antigenen gekommen war und ein immunologisches Gedächtnis entwickelt werden konnte, wurden die murinen CD19⁺ Milz-B-Zellen vermutlich in relativ kurzer Zeit nach der Inokulation mit CVB3H3 in einen aktivierten Zustand versetzt.

Ob und inwieweit eine solche Aktivierung die Infektion von murinen CD19⁺ B-Lymphozyten beeinflusst, wurde in einem *In vitro*-Experiment untersucht. Dabei erfolgte in Anlehnung an eine Studie von Snapper et al. (1996) eine Stimulation bzw. Anregung von Milz-B-Zellen nicht infizierter BALB/c-Mäuse mit bakteriellem LPS [310]. Nachdem in einem Vorversuch bestätigt wurde, dass eine solche Behandlung tatsächlich und vorrangig 24 h nach LPS-Zugabe zu einer deutlichen Aktivierung der primären murinen CD19⁺ B-Lymphozyten führte (Abb. 33), erfolgte die Infektion der Zellen mit CVB3 in weiteren Experimenten nach dieser LPS-IKZ. Parallel dazu wurde sichergestellt, dass dieser Aktivierungszustand unabhängig von der Virusinfektion über den gesamten Beobachtungszeitraum vorlag (Abb. 34). Nach Betrachtung der intrazellulären Virustiter konnte ein deutlicher Unterschied im Verlauf der Replikationskinetiken festgestellt werden. Dabei waren, wie Abbildung 35 zeigt, LPS-stimulierte B-Lymphozyten (2 -4 h p. i.) in der Lage, infektiöse Viruspartikel effektiver aufzunehmen als unbehandelte Zellen. Entsprechende Untersuchungen mit identischem Versuchsaufbau ergaben, dass auch die Stimulation humaner CD19⁺ B-Lymphozyten aus peripherem Blut mit LPS einen solchen Effekt hatte. Auch in diesem Fall war die Aufnahme von CVB3 deutlich gesteigert, wenn die Zellkulturen eine nachweislich erhöhte Stoffwechselaktivität zeigten (Abb. 36 und 37). Unklar ist jedoch, ob dabei eine Proliferation der B-Lymphozyten stattfand und somit die Zahl aufnahmefähiger Zellen erhöht wurde oder ob die Lymphozyten, welche ursprünglich bereits empfänglich für CVB3 waren durch ihre gesteigerte Stoffwechselaktivität mehr infektiöse Viruspartikel internalisieren konnten. Eine weitere Ursache für die erhöhten intrazellulären Titer könnte auch eine LPS-vermittelte Aktivierung einer zusätzlichen Menge an vorhandenen B-Zellen sein, welche dann in der Lage sind, CVB3 aufzunehmen. Unterstützt wird diese Theorie vor allem durch verschiedene Studien der Arbeitsgruppe um Lindsay Whitton, die belegen, dass eine CVB3-Infektion vom jeweiligen Zellzyklus-Status der Wirtszellen abhängig ist. So konnte gezeigt werden, dass die Synthese viraler Proteine in infizierten HeLa-Zellen, die sich in einem ruhenden Zustand (G₀-Phase) befanden sowie in solchen, die durch eine Behandlung mit Nocodazol bzw. Taxol in der G₂/M-Phase arretiert wurden, nur

eingeschränkt stattfand und demzufolge auch die Produktion neuer infektiöser Viruspartikel ineffektiv verlief. Wurde eine Teilung der Zellen nicht mehr unterbunden oder ein durch starke Kontakthemmung gekennzeichnete, konfluente Zellrasen verletzt, stiegen diese Parameter dagegen an [85]. Vertiefende Untersuchungen bestätigten diese Abhängigkeit der coxsackieviralen Replikation vom Aktivitätszustand der Zielzellen und zeigten zudem eine Relevanz dieser Beobachtung bei der CVB3-Infektion teilungsfähiger Stammzellen im neonatalen ZNS [87, 88]. Diese Zellen werden durch das Virus selbst in einer für die virale Replikation geeigneten Zellzyklus-Phase arretiert, jedoch nicht in ihrer Migrations- und Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt. Nach Erreichen des Zielortes erfolgt dann die Freisetzung der reifen Nachkommenviren. Hinweise darauf, dass auch die Empfänglichkeit von Lymphozyten für CVB3 abhängig von deren Aktivierungszustand ist, geben Studien von Liu et al. (2000), Opavsky et al. (2002) und Mena et al. (1999). So wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass es bei Fehlen des T-Zell-Aktivierungsenzyms p56^{lck} zu einer verringerten Virusvermehrung kommt und entsprechende Knock out-Mäuse resistent für eine CVB3-induzierte Myokarditis sind [209, 255]. Zudem ergaben *In situ*-Hybridisierungsanalysen, dass eine CVB3-Replikation im murinen Milzgewebe hauptsächlich in B-Lymphozyten stattfindet, welche in die sekundären Keimzentren der weißen Pulpa einwandern, in denen eine Proliferation dieser Zellen stattfindet, was wiederum die Ergebnisse aus Abbildung 27 bestätigt. Da aufgrund des fehlenden Kontakts mit einem Pathogen ein Großteil der CD19⁺ Milz-B-Zellen im nicht infizierten Versuchstier vermutlich in einem ruhenden Zustand (G₀-Phase) vorliegt, ist die unter *In vitro*-Bedingungen beobachtete eingeschränkte Replikation von CVB3 in diesen Zellen und die im Gegensatz dazu erhöhte Empfänglichkeit von B-Lymphozyten aus infizierten Mäusen nunmehr erklärbar.

Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Studien lässt sich demnach feststellen, dass auch eine Infektion primärer muriner und humaner CD19⁺ B-Lymphozyten mit CVB3 abhängig ist vom jeweiligen Aktivierungsstatus der Zelle. Eine tatsächliche Assoziation der viralen Replikation mit dem Zellzyklus müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

5.4 Apoptose in CVB3-infizierten murinen und humanen CD19⁺ B-Zellen

5.4.1 Einfluss von Pan-Caspase-Inhibitoren *in vitro*

Wie bereits unter 2.4.4 beschrieben, ist CVB3 in der Lage, in verschiedenen Zelllinien [30, 219, 220] aber u. a. auch im Herzgewebe [99, 129, 132, 172, 277] Apoptose auszulösen. Dabei wurde in den meisten Fällen auch eine Beteiligung zellulärer Caspasen und insbesondere die der Casp 3 nachgewiesen [30, 31, 39, 54, 219, 304, 379]. Um zu untersu-

chen, ob eine Infektion CD19⁺ B-Zellen durch CVB3 ebenfalls mit der Induktion apoptotischer Prozesse einhergeht, wurden zwei verschiedene Pan-Caspase-Inhibitoren verwendet – Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH. Beide Substanzen binden aufgrund des integrierten Aspartat-Rests als Substrate an das aktive Zentrum aller Caspasen und sind durch die terminale Benzoylcarbonyl-Gruppe (Z-) bzw. das endständige Chinolin (Q-) in der Lage, die Zellmembran leicht zu passieren. Die Fluoromethylketon (-FMK)- bzw. die Difluorophenoxymethyl (-OPH)-Gruppe führt dagegen zu einer irreversiblen, kovalenten Bindung der Substanzen an das Cystein des aktiven Zentrums der Caspasen und dadurch zu deren Blockierung. Trotz der postulierten Spezifität von Z-VAD-FMK für eine Inaktivierung zellulärer Caspasen und seiner Verwendung bei zahlreichen Apoptosestudien konnte bereits 1999 gezeigt werden, dass die Substanz unspezifisch auch andere Proteasen wie Cathepsin B und Cathepsin H inhibiert, da diese ebenfalls ein Cystein im aktiven Zentrum besitzen [287]. Deszcz et al. (2004) beschrieben zudem eine zeitlich begrenzte hemmende Wirkung von Z-VAD-FMK auf die Protease 2A des Humanen Rhinovirus 2 (HRV2), was eine Spaltung des zellulären Substrats eIF4GI verhinderte. Da der Einsatz einer nicht am Aspartat-Rest methylierten Inhibitor-Form keinen Einfluss auf die 2A-Aktivität zeigte, wurde auf eine Bedeutung dieser Methylgruppe für die unspezifische inhibitorische Wirkung von Z-VAD-FMK geschlossen. Dabei wird vermutlich die negative Ladung der Carboxylgruppe durch die Methylierung maskiert und so ein Eintritt des Inhibitors in die Substratbindungstasche der viralen Protease ermöglicht. Der transiente Charakter der beobachteten Protease-Inhibition ist auf eine rasche Demethylierung von Z-VAD-FMK durch intrazelluläre Esterasen und die daraus folgende Verhinderung der unspezifischen Bindung zurückzuführen [65]. Diese Ergebnisse konnten später ebenfalls für die viralen Proteasen 2A und 3C von CVB3 durch Martin et al. bestätigt werden. Auch die enzymatische Aktivität dieser Proteine wird in Anwesenheit von Z-VAD-FMK transient blockiert, was zu einer Inhibierung der Virusreplikation führte. Gleichzeitig konnte für den nicht methylierten Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH eine solche unspezifische Bindung an die coxsackieviralen Proteasen aufgrund einer vollständigen Spaltung des Substratproteins PABP ausgeschlossen werden, was eine Spezifität dieser Substanz für die Inaktivierung zellulärer Caspasen belegt [219].

In den meisten Studien zur Analyse Caspase-abhängiger apoptotischer Prozesse werden Inhibitor-Konzentrationen von 50-200 µM eingesetzt [31, 64, 219], so dass in der vorliegenden Arbeit für beide Substanzen eine Endkonzentration von 200 µM verwendet wurde. Die Zugabe fand dabei stets zeitgleich mit der CVB3-Infektion statt, deren anschließender Verlauf durch eine Bestimmung der Virustiter sowohl intrazellulär als auch im Kulturüberstand verfolgt wurde. Einen deutlichen Einfluss zeigten Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH auf

die Virusreplikation in humanen Raji-Zellen. Im Gegensatz zu Kontrollkulturen, wo eine normal verlaufende Virusvermehrung stattfand, waren die Gesamtvirustiter in beiden Inhibitor-behandelten Kulturen 7 h p. i. signifikant niedriger (Abb. 38), was sowohl auf eine reduzierte intrazelluläre als auch extrazelluläre Menge an infektiösen Partikeln zurückzuführen ist (Tab. 9). Dabei war vor allem im intrazellulären Kompartiment ein starker hemmender Effekt durch Z-VAD-FMK zu verzeichnen, was vermutlich in der unspezifischen Wirkung begründet liegt. Auch der durch Deszcz et al. (2004) und Martin et al. (2007) beschriebene transiente Charakter dieser Hemmung konnte hier bestätigt werden [65, 219]. Abbildung 38C zeigt, dass 7 h nach der Infektion Z-VAD-FMK deutlich stärker inhibitorisch wirkte als Q-VD-OPH, was auf einen additiven Effekt aus der Hemmung der zellulären Caspasen und der Blockierung der viralen Proteasen schließen lässt. Da später (11 h p. i.) der inhibitorische Effekt beider Substanzen auf die Virusreplikation wieder vergleichbar war, kann davon ausgegangen werden, dass zwischen 7-11 h p. i. endogene Esterasen zur Demethylierung von Z-VAD-FMK führten und somit eine Hemmung von 2A^{pro} und 3C^{pro} nicht mehr möglich war. Die an diesem Zeitpunkt beobachtete Inhibierung der viralen Replikation wurde demnach lediglich durch eine Z-VAD-FMK- bzw. Q-VD-OPH-bedingte Inaktivierung der zellulären Caspasen verursacht. Während in Q-VD-OPH-behandelten Kulturen über den gesamten Beobachtungszeitraum eine hemmende Wirkung auf die Virusvermehrung in Raji-Zellen detektiert werden konnte, war nach Zugabe von Z-VAD-FMK 24 h p. i. ein geringerer inhibitorischer Effekt auf die intrazelluläre Viruskonzentration im Vergleich zu DMSO-Kontrollen zu verzeichnen (Abb. 38A/C und Tab. 9). Dies weist auf eine uneingeschränkte CVB3-Replikation in diesen Kulturen zwischen 11-24 h p. i. hin. Mögliche Ursachen dafür, wie z. B. ein in diesen Zellen auftretender unspezifisch hemmender Effekt durch Q-VD-OPH, können jedoch aus der vorliegende Datenlage allein nicht abgeleitet werden und müssten in weiterführenden Studien analysiert werden. Bei Betrachtung der extrazellulären Viruskonzentrationen zeigte sich zudem ein deutlicher inhibitorischer Effekt beider Caspase-Inhibitoren auf die Freisetzung reifer Viruspartikel (Abb. 38B und Tab. 9). Während nach Zugabe von DMSO bereits 7 h p. i. ein Anstieg der Viruskonzentrationen im umgebenden Medium ermittelt wurde und auch im weiteren Verlauf bis 24 h p. i. reife Viruspartikel freigesetzt wurden, war dieser letzte Schritt des viralen Vermehrungszyklus in Inhibitor-behandelten Kulturen stark gehemmt. Auch Martin et al. (2007) konnten zeigen, dass Q-VD-OPH einen hemmenden Einfluss auf die CVB3-Replikation in 293-Zellen und im Speziellen auf die Virusfreisetzung hat [219] und zudem die Gesamtvirustiter generell reduziert werden. Weiterhin wiesen Studien von Carthy et al. nach einer Behandlung infizierter HeLa-Zellen mit Z-VAD-FMK oder nach Überexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L und der damit einhergehenden fehlenden

Caspase-Aktivität eine reduzierte Virusfreisetzung nach [30, 31]. Desczc et al. (2005) fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen apoptotischen Prozessen und der Freisetzung reifer Partikel des HRV14 [64]. Eine Infektion von Raji-Zellen mit dem rekombinanten CVB3H3/EGFP zeigte, dass eine Inaktivierung der zellulären Caspasen auch die Virusproteinsynthese beeinträchtigt (Abb. 43). Während in Kontrollkulturen bereits 7 h p. i. eine deutliche virale Translation stattfand, die im weiteren Verlauf mit einer Lyse der infizierten Zellen einherging und somit 24 h p. i. nur noch wenige grün fluoreszierende Zellen detektierbar waren, konnte in Anwesenheit der beiden Inhibitoren eine deutliche Hemmung der Virusproteinsynthese beobachtet werden. Zudem war in Z-VAD-FMK-behandelten Kulturen 11 h p. i. eine deutliche Steigerung des Anteils grüner Zellen und damit viraler Vermehrungsvorgänge detektierbar. Die Zugabe von Q-VD-OPH unterdrückte dagegen über den gesamten Beobachtungszeitraum die virale Translation nahezu vollständig. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in Abbildung 38 dargestellten Resultaten und bestätigen die starke Abhängigkeit der CVB3-Vermehrung in Raji-Zellen von Caspase-vermittelten apoptotischen Prozessen.

Die Behandlung CVB3-infizierter muriner CD19⁺ Milz-B-Lymphozyten mit einer der beiden Substanzen hatte einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation. Wie Abbildung 39 zeigt, führte eine Hemmung der Caspasen 6 h p. i. im Vergleich zu DMSO-Kontrollkulturen zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtvirustiters auf 28 % im Falle einer Z-VAD-FMK-Behandlung bzw. auf 31 % nach Zugabe des nicht methylierten Q-VD-OPH. Während jedoch in Z-VAD-FMK-Kulturen zu Beginn der Infektion eine verstärkte Virusaufnahme stattfand und der inhibitorische Effekt erst an diesem Zeitpunkt (6 h p. i.) zu verzeichnen war, unterdrückte Q-VD-OPH die Partikelaufnahme und die Bildung infektiöser Viren im Zellinneren über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu vollständig (Abb. 40). Demzufolge sind die 18 h p. i. in diesen Kulturen ermittelten erhöhten intrazellulären Partikelmengen nicht, wie bei Raji-Zellen, Ursache einer gehemmten Virusfreisetzung, sondern sind auf die stark abnehmenden Virionenkonzentration in Kontrollkulturen zurückzuführen. Auch hier konnten diese Ergebnisse nach einer Infektion dieser Zellen mit CVB3H3/EGFP und einer anschließenden EGFP-spezifischen Western Blot-Analyse bestätigt werden. Die Endkonzentration der beiden Caspase-Inhibitoren wurde dabei allerdings aufgrund der über 3 Tage andauernden Infektion auf 50 µM herabgesetzt. Dafür erfolgte die Applikation jedoch alle 12 h. Abbildung 44 zeigt, dass die virale Bildung von EGFP in murinen CD19⁺ B-Lymphozyten durch die Zugabe eines der beiden Caspase-Inhibitoren beeinträchtigt wird. Im Falle von Q-VD-OPH war dabei eine deutlich stärkere Hemmung der viralen Translation detektierbar als bei Z-VAD-FMK-behandelten Kulturen. Dies ist vermutlich auf die bereits erwähnte nahezu vollständige Inhibition der viralen

Replikation durch Q-VD-OPH zurückzuführen, während, wie Abbildung 40 dargestellt, nach Z-VAD-FMK-Zugabe eine verstärkte Virusaufnahme mit anschließender schneller und stetiger Abnahme der intrazellulären Virustiter stattfindet. Zeitlich sind beide Versuchsansätze jedoch nicht vergleichbar, da zum einen die verwendeten Substanzen geringer konzentriert eingesetzt wurden und zum anderen das rekombinante CVB3H3/EGFP im Vergleich zum Wildtypstamm eine veränderte Wachstumskinetik aufweist.

Auch in primären humanen CD19⁺ B-Lymphozyten, welche zeitgleich zur CVB3-Infektion mit Q-VD-OPH versetzt wurden, war die Virusreplikation über den gesamten Beobachtungszeitraum eingeschränkt, was 6 h p. i. im Vergleich zu DMSO-Kulturen zu einer Reduktion des Gesamtvirustiters um 64 % führte (Abb. 41). Intrazellulär konnte jedoch, wie Abbildung 42 zeigt, sowohl in DMSO- als auch in Q-VD-OPH-behandelten Zellen eine virale Replikation nachgewiesen werden, die zu vergleichbar hohen maximalen Virusmengen führte. Während in DMSO-behandelten Zellen bereits 6 h p. i. Maximaltiters zu verzeichnen waren, wurden diese nach Zugabe von Q-VD-OPH erst 12 h p. i. erreicht. Die zu diesem späten Zeitpunkt im Vergleich zu Kontrollkulturen signifikant erhöhten Partikelkonzentrationen könnten demnach in einer verzögert ablaufende Virusreplikation oder aber durch eine gehemmte Freisetzung reifer Viruspartikel begründet sein. Im Gegensatz dazu zeigte Z-VAD-FMK überraschenderweise keinen inhibitorischen Effekt auf die Vermehrung von CVB3 in humanen CD19⁺ B-Lymphozyten (Abb. 41 und Abb. 42). Vielmehr wurde vor allem die Virusaufnahme begünstigt bzw. beschleunigt. Ausschließlich 2 h p. i. konnte eine Reduktion der intrazellulären Virustiter im Vergleich zu DMSO-Kulturen festgestellt werden. Im weiteren Verlauf lagen die Partikelmengen dagegen über denen der Kontrollen, unterschieden sich jedoch 12 h p. i. nicht mehr von diesen. Eine denkbare Ursache für eine solche Abweichung von den durch eine Z-VAD-FMK-Behandlung erzielten Ergebnissen in infizierten humanen Raji-Zellen und murinen CD19⁺ B-Zellen sowie von den Resultaten der Studie von Martin et al. (2007) könnte ein unbekannter unspezifischer Effekt durch die Bindung des Inhibitors an andere unbekannte zelluläre Proteine oder Proteasen und eine daraus folgende Begünstigung der Virusaufnahme bzw. -Replikation sein. Da dies jedoch rein spekulativ ist, müsste diesem positiven Effekt von Z-VAD-FMK in humanen CD19⁺ B-Zellen in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen werden. Auch hier konnten die in den Abbildungen 41 und 42 dargestellten Ergebnisse durch eine Infektion humaner CD19⁺ B-Lymphozyten mit CVB3H3/EGFP und einer gleichzeitigen Behandlung mit Z-VAD-FMK oder Q-VD-OPH bzw. DMSO (50 µM alle 12 h) auf Translationsebene bestätigt werden. Da die methylierte Substanz, wie oben bereits erwähnt, die Virusvermehrung begünstigte, war auch die virale Bildung von EGFP nicht inhibiert. Das in Q-VD-OPH-behandelten Kulturen detektierte, im Vergleich zu

DMSO-Kontrollen leicht intensivere, EGFP-Signal ist dagegen vermutlich auf die verzögerte Virusreplikation und/oder gehemmte Partikelfreisetzung aus diesen Zellen zurückzuführen. Die beobachtete differente Wirkung der beiden eingesetzten Pan-Caspase-Inhibitoren in den verschiedenen Zellen könnte auf ihre unterschiedliche Herkunft zurückzuführen sein. Zum einen zeigt CVB3 in immortalisierten Raji-Zellen, wie bereits unter 5.1 erwähnt, eine deutlich andere Wachstumskinetik als in den primären B-Lymphozyten. Zum anderen entstammt die humane CD19⁺ Zellpopulation, im Gegensatz zu den aus murinem Milzgewebe isolierten Lymphozyten, dem peripheren Blut und beinhaltet somit vermutlich andere B-Zellphenotypen.

Da die Applikation des spezifischen Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-OPH jedoch in allen drei untersuchten Zelltypen eine deutliche Beeinträchtigung der Virusvermehrung bewirkte, kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Replikation von CVB3 in diesen Lymphozyten eng mit apoptotischen Caspase-vermittelten Prozessen verbunden ist. Eine Inhibierung der Apoptose hatte dabei nicht nur eine Hemmung der Bildung infektiöser Partikel, sondern in Raji-Zellen und humanen Lymphozyten auch eine verminderte Virusfreisetzung zur Folge. Inwieweit es auch in diesen Zellen zu der in vielen Studien beschriebenen gezielten Induktion apoptotischer Prozesse durch CVB3 kommt, ist dabei noch unklar und müsste in weiterführenden Analysen untersucht werden [30, 31, 219]. Eine solche Induktion der Apoptose durch das Virus selbst wäre jedoch vor allem im Hinblick auf eine Infektion CD19⁺ B-Lymphozyten *in vivo* von großem Vorteil. Da infolge einer Apoptose-Inhibierung die Freisetzung reifer Nachkommenviren beeinträchtigt werden kann, ist davon auszugehen, dass dieser letzte Schritt der Virusvermehrung eng mit apoptotischen Zelltodvorgängen assoziiert ist. Die neu gebildeten infektiösen Partikel könnten dabei eingeschlossen in „apoptotic bodies“ freigesetzt und so, vom Immunsystem unerkannt, im Organismus verbreitet werden, um andere Zellen oder Gewebe zu infizieren. Eine Entzündungsreaktion mit nachfolgender Bekämpfung der Virusinfektion, welche unter normalen Bedingungen aufgrund einer Virusfreisetzung durch Zelllyse stattfinden würde, wäre somit weniger stark induziert.

5.4.2 *In vivo*-Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren

Wie bereits erwähnt und durch zahlreiche Studien belegt, stellen apoptotische Prozesse auch während einer CVB3-Infektion *in vivo* einen wichtigen pathogenetischen Aspekt dar [99, 129, 132, 172, 277]. Basierend auf diesen Daten und ausgehend von den vorangegangenen *In vitro*-Experimenten mit murinen CD19⁺ B-Lymphozyten sollte der Einfluss der bereits verwendeten Pan-Caspase-Inhibitoren – Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH – auch auf die CVB3-Replikation *in vivo* generell und insbesondere auf CD19⁺ B-Zellen unter-

sucht werden. In Anlehnung an Z-VAD-FMK-Applikationsdosen für das murine Tiermodell in einer Studie von Seery et al. (2001) [293] wurden dazu BALB/c-Mäusen 3 d nach einer CVB3-Infektion, d. h. zum Zeitpunkt, an dem der maximal mögliche Anteil an CD19⁺ B-Lymphozyten infiziert ist (Abb. 28C), 25 mg Z-VAD-FMK bzw. Q-VD-OPH pro kg Lebendgewicht gelöst in 25 µl DMSO i. v. verabreicht. Die Analyse der unterschiedlichen Parameter erfolgte dann aufgrund der vermuteten schnellen Wirksamkeit bereits 6 h nach der Gabe dieser Substanzen. Wie Abbildung 46 zeigt, konnte dabei ein deutlicher Effekt bei der Caspase-Inhibitoren auf die Viruslast in bestimmten Organen festgestellt werden. Im Pankreasgewebe waren dabei keine nennenswerten Unterschiede in der Menge infektiöser Viruspartikel zwischen den 3 infizierten Testgruppen zu verzeichnen (Abb. 46A), da dieses Organ den primären Ort für die coxsackievirale Replikation nach einer Infektion über die i. p. Route darstellt. Die während der 3-tägigen Inkubationszeit bis zum Analysezeitpunkt stattfindende starke Virusvermehrung mit progressiver Gewebszerstörung, konnte dabei vermutlich durch die kurzzeitige Behandlung mit einer der beiden Substanzen nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu hatte sowohl die *In vivo*-Applikation von Z-VAD-FMK als auch die Verabreichung von Q-VD-OPH einen deutlichen Effekt auf die Viruslast in sekundären Zielorganen (Abb. 46B/C). Im Myokard war eine Reduktion der Menge infektiöser Partikel um 29 % (Z-VAD-FMK) bzw. um 37 % (Q-VD-OPH) zu verzeichnen. Zudem wies das Milzgewebe nach Behandlung der Tiere mit einem der beiden Caspase-Inhibitoren im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrolltieren nur noch 54 % (Z-VAD-FMK) bzw. 49 % (Q-VD-OPH) der Virusmenge auf. Dies könnte zum einen auf einen direkten hemmenden Einfluss der Substanzen auf die virale Replikation im jeweiligen Gewebe selbst zurückzuführen sein. Zum anderen würde eine beeinträchtigte Verteilung infektiöser Partikel im Wirtsorganismus ebenfalls zu reduzierten Virustitern in diesen sekundären Zielorganen führen. Denkbar wäre zudem ein Zusammenspiel beider Aspekte. Da in der bereits erwähnten Studie von Mena et al. (1999) gezeigt werden konnte, dass die coxsackievirale Replikation und Virusverteilung in B-Zell-Knock out-Mäusen verzögert bzw. gehemmt ist, sollte zusätzlich der Einfluss beider Caspase-Inhibitoren auf die Infektion CD19⁺ Milz-B-Zellen der jeweiligen Tiere untersucht werden [232]. Abbildung 47 und 48 zeigen, dass die Lymphozyten behandelter Tiere nicht nur eine deutlich verringerte Viruslast in Form viraler RNA-Genome (Abb. 47B) aufwiesen, sondern, dass eine *In vivo*-Applikation von Pan-Caspase-Inhibitoren und somit eine Hemmung apoptotischer Prozesse auch den Anteil produktiv infizierter CD19⁺ B-Lymphozyten senkte (Abb. 48). Dabei ist zu erkennen, dass beide Parameter in etwa gleich stark durch Q-VD-OPH beeinflusst wurden, in Z-VAD-FMK-behandelten Tieren jedoch ein prozentualer Unterschied in der hemmenden Wirkung im Vergleich zu Kontrolltieren auftrat. Dies könnte zum einen auf die

beiden verwendeten Methoden und deren unterschiedliche Detektionssensitivität zurückzuführen sein; zum anderen ist es möglich, dass durch die bereits erwähnte direkte Wirkung von Z-VAD-FMK auf 2A^{pro} und 3C^{pro} und den sich daraus ergebenden starken Effekt auf die Synthese viraler Genome eine prozentual höhere Reduktion zustande kam als bei den durchgeführten ICA, mit Hilfe derer lediglich die Anzahl infizierter Zellen bestimmt wird. Ausgehend von diesen Ergebnissen zur Wirkung von Caspase-Inhibitoren auf CD19⁺ B-Lymphozyten und der Resultate von Mena et al. mit B-Zell-Knock out-Mäusen wäre es denkbar, dass der oben beschriebene Effekt beider Substanzen auf die Viruslast in Herz- und Milzgewebe auf eine verminderte Verteilung infektiöser Partikel aufgrund des reduzierten Anteils infizierter B-Zellen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann demnach festgestellt werden, dass es auch unter *In vivo*-Bedingungen zu apoptotischen Caspase-vermittelten Vorgängen in CVB3-infizierten CD19⁺ B-Lymphozyten des murinen Milzgewebes kommt. Da eine Inhibition dieser Prozesse zu einer deutlichen Reduktion der Viruslast in den Zellen sowie einer Verringerung des Anteils infizierter B-Lymphozyten führt, kann geschlossen werden, dass sowohl die Infektion an sich als auch die coxsackievirale Replikation in diesen Immunzellen abhängig von deren Apoptoseverhalten ist. Zudem deuten die beobachteten deutlich verringerten Virustiter in Herz- und Milzgewebe Z-VAD-FMK- und Q-VD-OPH-behandelter Versuchstiere auf eine Beteiligung der infizierten CD19⁺ B-Lymphozyten an der Verteilung infektiöser Partikel im Wirtsorganismus. Ausgehend von diesen in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen zur Wirkung von Caspase-Inhibitoren auf die CVB3-Replikation *in vitro* und *in vivo* (siehe 5.4.1 und 5.4.2) sowie unter Berücksichtigung einiger anderer Studien, in denen der Effekt solcher Fluoromethylketon-Derivate im Hinblick auf virale [62], bakterielle [33] und Protozoen-Infektionen [262] unter *In vivo*-Bedingungen untersucht wurde, weisen diese Substanzen ein therapeutisches Potential auf, welches für die Entwicklung neuer breit anwendbarer Behandlungsmethoden für unterschiedliche Erkrankungen herangezogen werden könnte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Als typischer Vertreter der Familie *Picornaviridae* besitzt das nichtumhüllte humanpathogene Coxsackievirus B3 (CVB3) ein einzelsträngiges positiv orientiertes RNA-Genom, welches von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen wird. Zusammen mit anderen Enteroviren verursacht besonders dieser Serotyp neben diversen schwerwiegenden Erkrankungen, wie Pankreatitis, aseptische Meningitis oder Enzephalitis bis zu 50 % der virusinduzierten akuten, subakuten sowie chronischen Myokarditiden und ca. 25 % der DCM. Trotz der sehr gut charakterisierten molekularbiologischen Eigenschaften dieser Viren ist die Pathogenese einer CVB3-Infektion bis heute nur unzureichend verstanden. Bekannt ist, dass das Virus neben primären Zielorganen, wie Herz, Pankreas oder ZNS auch Zellen des Immunsystems infizieren kann. Dabei wurde gezeigt, dass besonders B-Zellen lymphatischer Gewebe wie der Milz oder der Lymphknoten empfänglich für CVB3 sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CVB3 in der Lage ist, in primären murinen und humanen CD19⁺ B-Lymphozyten aktiv zu replizieren. Dabei wird die virale Infektiosität für diese CAR-negativen Zellen in Anwesenheit eines verdünnten virusspezifischen Anti-Serums deutlich gesteigert, was zu erhöhten intrazellulären Partikelkonzentrationen führt. Die daraufhin vermutete Beteiligung CVB3-spezifischer Antikörper an diesem Prozess wurde zusätzlich durch eine Verdünnung des Serums und die Behandlung mit dem Fc-bindenden Protein A bestätigt, wobei in beiden Fällen die gesteigerte Virusaufnahme in murine B-Zellen gehemmt werden konnte. Zudem zeigte das verwendete Anti-Serum nahezu keine virusneutralisierende Wirkung, was auf eine Beteiligung nicht neutralisierender Immunglobuline hindeutet. Untersuchungen des zugrunde liegenden Mechanismus ergaben, dass dieser Antikörper-abhängige Eintritt von CVB3 scheinbar nicht durch zelluläre Fcγ-Rezeptoren auf der Oberfläche muriner CD19⁺ B-Zellen vermittelt wird. Da eine Hitze-Inaktivierung des verwendeten Serums zur Inhibierung des Prozesses führte, wurde vielmehr eine Beteiligung des Komplementsystems bzw. bestimmter Komplementkomponenten vermutet. Eine Stimulation der B-Zellen durch LPS oder eine vorangegangene Infektion *in vivo* führte ebenfalls zu einer Steigerung der Empfänglichkeit dieser Immunzellen. In Übereinstimmung mit den *In vitro*-Daten konnte auch nach einer Infektion männlicher BALB/c-Mäuse mit CVB3 nachgewiesen werden, dass CD19⁺ B-Lymphozyten des Milzgewebes infiziert werden, wobei 3 d p. i. ein sehr geringer jedoch maximaler Prozentsatz von etwa 0,6-1 % an virus-positiven Zellen vorliegt. Der Einsatz von zwei unterschiedlichen Pan-Caspase-Inhibitoren – Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH – ergab weiterhin, dass die aktive Replikation in primären murinen und huma-

nen CD19⁺ B-Lymphozyten sowie Raji-Zellen und die anschließende Virusfreisetzung mit apoptotischen Prozessen assoziiert ist. Dieser Zusammenhang konnte nachfolgend auch durch eine *In vivo*-Applikation der beiden Substanzen im Zuge einer CVB3-Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse bestätigt werden. Dabei hatte diese Behandlung nicht nur eine Senkung der Viruslast in Herz- und Milzgewebe, sondern auch eine Reduktion des Anteils infizierter CD19⁺ B-Lymphozyten um mehr als 40 % zur Folge.

7. LITERATUR

1. **Adams, J. M.** 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**:2481-95.
2. **Ahmad, M., S. M. Srinivasula, L. Wang, R. V. Talanian, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri.** 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* **57**:615-9.
3. **Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan.** 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**:171.
4. **Alter, P., M. Jobmann, E. Meyer, S. Pankuweit, and B. Maisch.** 2001. Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? An endomyocardial biopsy study. *Cardiovasc Pathol* **10**:229-34.
5. **Anderson, D. R., J. E. Wilson, C. M.Carthy, D. Yang, R. Kandolf, and B. M. McManus.** 1996. Direct interactions of coxsackievirus B3 with immune cells in the splenic compartment of mice susceptible or resistant to myocarditis. *J Virol* **70**:4632-45.
6. **Andreoletti, L., D. Hober, P. Becquart, S. Belaich, M. C. Copin, V. Lambert, and P. Wattre.** 1997. Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection. *J Med Virol* **52**:206-14.
7. **Archard, L. C., M. A. Khan, B. A. Soteriou, H. Zhang, H. J. Why, N. M. Robinson, and P. J. Richardson.** 1998. Characterization of Coxsackie B virus RNA in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy by nucleotide sequencing of reverse transcription-nested polymerase chain reaction products. *Hum Pathol* **29**:578-84.
8. **Arita, M., H. Horie, M. Arita, and A. Nomoto.** 1999. Interaction of poliovirus with its receptor affords a high level of infectivity to the virion in poliovirus infections mediated by the Fc receptor. *J Virol* **73**:1066-74.
9. **Ashkenazi, A., and V. M. Dixit.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-8.
10. **Badorff, C., B. Fichtlscherer, A. Muelsch, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler.** 2002. Selective delivery of nitric oxide to a cellular target: a pseudosubstrate-coupled dinitrosyl-iron complex inhibits the enteroviral protease 2A. *Nitric Oxide* **6**:305-12.
11. **Badorff, C., G. H. Lee, B. J. Lamphear, M. E. Martone, K. P. Campbell, R. E. Rhoads, and K. U. Knowlton.** 1999. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy [see comments]. *Nat Med* **5**:320-6.
12. **Banner, D. W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, and W. Lesslauer.** 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**:431-45.
13. **Bartsch, H. D., K. O. Habermehl, and W. Diefenthal.** 1969. Correlation between polio-myelitisvirus-reproduction-cycle, chromosomal alterations and lysosomal enzymes. *Arch Gesamte Virusforsch* **27**:115-27.
14. **Bauer, S., G. Gottesman, L. Sirota, I. Litmanovitz, S. Ashkenazi, and I. Levi.** 2002. Severe Coxsackie virus B infection in preterm newborns treated with pleconaril. *Eur J Pediatr* **161**:491-3.
15. **Baxt, B., and P. W. Mason.** 1995. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptor-mediated adsorption. *Virology* **207**:503-9.
16. **Beck, M. A., N. M. Chapman, B. M. McManus, J. C. Mullican, and S. Tracy.** 1990. Secondary enterovirus infection in the murine model of myocarditis. Pathologic and immunologic aspects. *Am J Pathol* **136**:669-81.
17. **Bergelson, J. M., M. Chan, K. R. Solomon, N. F. St John, H. Lin, and R. W. Finberg.** 1994. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6245-8.
18. **Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-3.

19. **Bergelson, J. M., A. Krithivas, L. Celi, G. Droguett, M. S. Horwitz, T. Wickham, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1998. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* **72**:415-9.
20. **Bergelson, J. M., J. G. Mohanty, R. L. Crowell, N. F. St John, D. M. Lublin, and R. W. Finberg.** 1995. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* **69**:1903-6.
21. **Berke, G.** 1995. The CTL's kiss of death. *Cell* **81**:9-12.
22. **Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherland, D. R. Green, and G. S. Salvesen.** 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**:529-41.
23. **Bowles, N. E., T. A. Bayston, H. Y. Zhang, D. Doyle, R. J. Lane, L. Cunningham, and L. C. Archard.** 1993. Persistence of enterovirus RNA in muscle biopsy samples suggests that some cases of chronic fatigue syndrome result from a previous, inflammatory viral myopathy. *J Med* **24**:145-60.
24. **Bowles, N. E., P. J. Richardson, E. G. Olsen, and L. C. Archard.** 1986. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* **1**:1120-3.
25. **Brodsky, V., D. S. Sarkisov, A. M. Arefyeva, and N. W. Panova.** 1993. DNA and protein relations in cardiomyocytes. Growth reserve in cardiac muscle. *Eur J Histochem* **37**:199-206.
26. **Brown, C. A., and J. B. O'Connell.** 1996. Implications of the Myocarditis Treatment Trial for clinical practice. *Curr Opin Cardiol* **11**:332-6.
27. **Brunner, J. E., J. H. Nguyen, H. H. Roehl, T. V. Ho, K. M. Swiderek, and B. L. Semler.** 2005. Functional interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C with poliovirus RNA synthesis initiation complexes. *J Virol* **79**:3254-66.
28. **Campanella, M., A. S. de Jong, K. W. Lanke, W. J. Melchers, P. H. Willems, P. Pinton, R. Rizzuto, and F. J. van Kuppeveld.** 2004. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem* **279**:18440-50.
29. **Cardosa, M. J., J. S. Porterfield, and S. Gordon.** 1983. Complement receptor mediates enhanced flavivirus replication in macrophages. *J Exp Med* **158**:258-63.
30. **Carthy, C. M., D. J. Granville, K. A. Watson, D. R. Anderson, J. E. Wilson, D. Yang, D. W. Hunt, and B. M. McManus.** 1998. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* **72**:7669-75.
31. **Carthy, C. M., B. Yanagawa, H. Luo, D. J. Granville, D. Yang, P. Cheung, C. Cheung, M. Esfandiari, C. M. Rudin, C. B. Thompson, D. W. Hunt, and B. M. McManus.** 2003. Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection. *Virology* **313**:147-57.
32. **Carthy, C. M., D. Yang, D. R. Anderson, J. E. Wilson, and B. M. McManus.** 1997. Myocarditis as systemic disease: new perspectives on pathogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**:997-1003.
33. **Catalan, M. P., J. Esteban, D. Subira, J. Egido, and A. Ortiz.** 2003. Inhibition of caspases improves bacterial clearance in experimental peritonitis. *Perit Dial Int* **23**:123-6.
34. **Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri, and Y. Shi.** 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **104**:769-80.
35. **Chalon, M. P., R. W. Milne, and J. P. Vaerman.** 1979. Interactions between mouse immunoglobulins and staphylococcal protein A. *Scand J Immunol* **9**:359-64.
36. **Chang, D. W., Z. Xing, V. L. Capacio, M. E. Peter, and X. Yang.** 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J* **22**:4132-42.
37. **Chang, H. Y., and X. Yang.** 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:821-46.
38. **Chapman, N. M., Z. Tu, S. Tracy, and C. J. Gauntt.** 1994. An infectious cDNA copy of the genome of a non-cardiovirulent coxsackievirus B3 strain: its complete sequence analysis and comparison to the genomes of cardiovirulent coxsackieviruses. *Arch Virol* **135**:115-30.
39. **Chau, D. H., J. Yuan, H. Zhang, P. Cheung, T. Lim, Z. Liu, A. Sall, and D. Yang.** 2007. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* **12**:513-24.

40. **Chehadeh, W., A. Bouzidi, G. Alm, P. Wattre, and D. Hober.** 2001. Human antibodies isolated from plasma by affinity chromatography increase the coxsackievirus B4-induced synthesis of interferon-alpha by human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Gen Virol* **82**:1899-907.
41. **Chehadeh, W., P. E. Lobert, P. Sauter, A. Goffard, B. Lucas, J. Weill, M. C. Vantyghem, G. Alm, P. Pigny, and D. Hober.** 2005. Viral protein VP4 is a target of human antibodies enhancing coxsackievirus B4- and B3-induced synthesis of alpha interferon. *J Virol* **79**:13882-91.
42. **Chehadeh, W., J. Weill, M. C. Vantyghem, G. Alm, J. Lefebvre, P. Wattre, and D. Hober.** 2000. Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *J Infect Dis* **181**:1929-39.
43. **Chen, R. F., W. T. Yeh, M. Y. Yang, and K. D. Yang.** 2001. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **30**:1-7.
44. **Cho, C. T., K. K. Feng, V. P. McCarthy, and M. F. Lenahan.** 1982. Role of antiviral antibodies in resistance against coxsackievirus B3 infection: interaction between preexisting antibodies and an interferon inducer. *Infect Immun* **37**:720-7.
45. **Chow, L. H., C. J. Gauntt, and B. M. McManus.** 1991. Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest* **64**:55-64.
46. **Clark, M. E., T. Hammerle, E. Wimmer, and A. Dasgupta.** 1991. Poliovirus proteinase 3C converts an active form of transcription factor III κ to an inactive form: a mechanism for inhibition of host cell polymerase III transcription by poliovirus. *Embo J* **10**:2941-7.
47. **Clark, M. E., P. M. Lieberman, A. J. Berk, and A. Dasgupta.** 1993. Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **13**:1232-7.
48. **Clas, F., and M. Loos.** 1981. Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of Salmonella minnesota. *Infect Immun* **31**:1138-44.
49. **Clavell, M., B. Barkemeyer, B. Martinez, R. Craver, H. Correa, R. Gohd, and E. Schmidt-Sommerfeld.** 1999. Severe hepatitis in a newborn with coxsackievirus B5 infection. *Clin Pediatr (Phila)* **38**:739-41.
50. **Cohen, C. J., J. T. Shieh, R. J. Pickles, T. Okegawa, J. T. Hsieh, and J. M. Bergelson.** 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:15191-6.
51. **Cohen, J. I.** 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* **343**:481-92.
52. **Cornell, C. T., W. B. Kiosses, S. Harkins, and J. L. Whitton.** 2007. Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I. *J Virol* **81**:6785-97.
53. **Coyne, C. B., and J. M. Bergelson.** 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**:119-31.
54. **Cunningham, K. A., N. M. Chapman, and S. D. Carson.** 2003. Caspase-3 activation and ERK phosphorylation during CVB3 infection of cells: influence of the coxsackievirus and adenovirus receptor and engineered variants. *Virus Res* **92**:179-86.
55. **Cunningham, M. W., S. M. Antone, J. M. Gulizia, B. M. McManus, V. A. Fischetti, and C. J. Gauntt.** 1992. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:1320-4.
56. **Dales, S., H. J. Eggers, I. Tamm, and G. E. Palade.** 1965. Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology* **26**:379-89.
57. **Dalldorf, G.** 1950. The coxsackie viruses. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **26**:329-335.
58. **Dalldorf, G., and G. M. Sickles.** 1948. An unidentified, filterable agent isolated from feces of children with paralysis. *Science* **108**:61-62.
59. **Dan, M., and J. K. Chantler.** 2005. A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal infection. *J Virol* **79**:9285-95.
60. **Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer.** 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**:205-19.
61. **Daughaday, C. C., W. E. Brandt, J. M. McCown, and P. K. Russell.** 1981. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun* **32**:469-73.

62. **DeBiasi, R. L., B. A. Robinson, B. Sherry, R. Bouchard, R. D. Brown, M. Rizeq, C. Long, and K. L. Tyler.** 2004. Caspase inhibition protects against reovirus-induced myocardial injury in vitro and in vivo. *J Virol* **78**:11040-50.
63. **Des Prez, R. M., C. S. Bryan, J. Hawiger, and D. G. Colley.** 1975. Function of the classical and alternate pathways of human complement in serum treated with ethylene glycol tetraacetic acid and MgCl₂-ethylene glycol tetraacetic acid. *Infect Immun* **11**:1235-43.
64. **Deszcz, L., E. Gaudernak, E. Kuechler, and J. Seipelt.** 2005. Apoptotic events induced by human rhinovirus infection. *J Gen Virol* **86**:1379-89.
65. **Deszcz, L., J. Seipelt, E. Vassilieva, A. Roetzer, and E. Kuechler.** 2004. Antiviral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase. *FEBS Lett* **560**:51-5.
66. **Doedens, J., L. A. Maynell, M. W. Klymkowsky, and K. Kirkegaard.** 1994. Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. *Arch Virol Suppl* **9**:159-72.
67. **Doedens, J. R., and K. Kirkegaard.** 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**:894-907.
68. **Donepudi, M., A. Mac Sweeney, C. Briand, and M. G. Grutter.** 2003. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* **11**:543-9.
69. **Duan, H., and V. M. Dixit.** 1997. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* **385**:86-9.
70. **Duhamel, R. C., P. H. Schur, K. Brendel, and E. Meezan.** 1979. pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. *J Immunol Methods* **31**:211-7.
71. **Dunn, G., N. T. Begg, N. Cammack, and P. D. Minor.** 1990. Virus excretion and mutation by infants following primary vaccination with live oral poliovaccine from two sources. *J Med Virol* **32**:92-5.
72. **Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, and F. L. Scott.** 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**:988-94.
73. **Eggleton, P., K. B. Reid, and A. J. Tenner.** 1998. C1q--how many functions? How many receptors? *Trends Cell Biol* **8**:428-31.
74. **Esfandiarei, M., S. Boroomand, A. Suarez, X. Si, M. Rahmani, and B. McManus.** 2007. Cocksackievirus B3 activates nuclear factor kappa B transcription factor via a phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B-dependent pathway to improve host cell viability. *Cell Microbiol* **9**:2358-71.
75. **Esfandiarei, M., H. Luo, B. Yanagawa, A. Suarez, D. Dabiri, J. Zhang, and B. M. McManus.** 2004. Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent. *J Virol* **78**:4289-98.
76. **Esfandiarei, M., and B. M. McManus.** 2008. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* **3**:127-55.
77. **Esfandiarei, M., A. Suarez, A. Amaral, X. Si, M. Rahmani, S. Dedhar, and B. M. McManus.** 2006. Novel role for integrin-linked kinase in modulation of coxsackievirus B3 replication and virus-induced cardiomyocyte injury. *Circ Res* **99**:354-61.
78. **Estrin, M., and S. A. Huber.** 1987. Cocksackievirus B3-induced myocarditis. Autoimmunity is L3T4+ T helper cell and IL-2 independent in BALB/c mice. *Am J Pathol* **127**:335-41.
79. **Etchison, D., S. C. Milburn, I. Edery, N. Sonenberg, and J. W. Hershey.** 1982. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* **257**:14806-10.
80. **Ey, P. L., S. J. Prowse, and C. R. Jenkin.** 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* **15**:429-36.
81. **Fairfax, A. J., and U. Groschel-Stewart.** 1977. Myosin autoantibodies detected by immunofluorescence. *Clin Exp Immunol* **28**:27-34.
82. **Fairweather, D., Z. Kaya, G. R. Shellam, C. M. Lawson, and N. R. Rose.** 2001. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* **16**:175-86.
83. **Faulkner, G. C., S. R. Burrows, R. Khanna, D. J. Moss, A. G. Bird, and D. H. Crawford.** 1999. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol* **73**:1555-64.
84. **Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele.** 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**:1371-87.

85. **Feuer, R., I. Mena, R. Pagarigan, M. K. Slifka, and J. L. Whitton.** 2002. Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation in vitro. *J Virol* **76**:4430-40.
86. **Feuer, R., I. Mena, R. R. Pagarigan, S. Harkins, D. E. Hassett, and J. L. Whitton.** 2003. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol* **163**:1379-93.
87. **Feuer, R., I. Mena, R. R. Pagarigan, D. E. Hassett, and J. L. Whitton.** 2004. Coxsackievirus replication and the cell cycle: a potential regulatory mechanism for viral persistence/latency. *Med Microbiol Immunol* **193**:83-90.
88. **Feuer, R., R. R. Pagarigan, S. Harkins, F. Liu, I. P. Hunziker, and J. L. Whitton.** 2005. Coxsackievirus targets proliferating neuronal progenitor cells in the neonatal CNS. *J Neurosci* **25**:2434-44.
89. **Fine, D. P., S. R. Marney, Jr., D. G. Colley, J. S. Sargent, and R. M. Des Prez.** 1972. C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J Immunol* **109**:807-9.
90. **Fohlman, J., K. Pauksen, T. Hyypia, G. Eggertsen, A. Ehrnst, N. G. Ilback, and G. Friman.** 1996. Antiviral treatment with WIN 54 954 reduces mortality in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Circulation* **94**:2254-9.
91. **Fohlman, J., K. Pauksen, B. Morein, U. Bjare, N. G. Ilback, and G. Friman.** 1993. High yield production of an inactivated coxsackie B3 adjuvant vaccine with protective effect against experimental myocarditis. *Scand J Infect Dis Suppl* **88**:103-8.
92. **Frisk, G., E. Nilsson, A. Ehrnst, and H. Diderholm.** 1989. Enterovirus IgM detection: specificity of mu-antibody-capture radioimmunoassays using virions and procapsids of Coxsackie B virus. *J Virol Methods* **24**:191-202.
93. **Fuchtenbusch, M., A. Irnstetter, G. Jager, and A. G. Ziegler.** 2001. No evidence for an association of coxsackie virus infections during pregnancy and early childhood with development of islet autoantibodies in offspring of mothers or fathers with type 1 diabetes. *J Autoimmun* **17**:333-40.
94. **Fujioka, S., Y. Kitaura, A. Ukimura, H. Deguchi, K. Kawamura, T. Isomura, H. Suma, and A. Shimizu.** 2000. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **36**:1920-6.
95. **Gauntt, C., and S. Huber.** 2003. Coxsackievirus experimental heart diseases. *Front Biosci* **8**:e23-35.
96. **Gauntt, C. J.** 1997. Roles of the humoral response in coxsackievirus B-induced disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **223**:259-82.
97. **Gauntt, C. J., H. M. Arizpe, A. L. Higdon, M. M. Rozek, R. Crawley, and M. W. Cunningham.** 1991. Anti-Coxsackievirus B3 neutralizing antibodies with pathological potential. *Eur Heart J* **12 Suppl D**:124-9.
98. **Gauntt, C. J., H. M. Arizpe, A. L. Higdon, H. J. Wood, D. F. Bowers, M. M. Rozek, and R. Crawley.** 1995. Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis. *J Immunol* **154**:2983-95.
99. **Gebhard, J. R., C. M. Perry, S. Harkins, T. Lane, I. Mena, V. C. Asensio, I. L. Campbell, and J. L. Whitton.** 1998. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol* **153**:417-28.
100. **Geller, T. J., and D. Condie.** 1995. A case of protracted coxsackie virus meningoencephalitis in a marginally immunodeficient child treated successfully with intravenous immunoglobulin. *J Neurol Sci* **129**:131-3.
101. **Gergely, J., and G. Sarmay.** 1990. The two binding-site models of human IgG binding Fc gamma receptors. *Faseb J* **4**:3275-83.
102. **Gimenez, H. B., H. M. Keir, and P. Cash.** 1989. In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cells by human sera. *J Gen Virol* **70 (Pt 1)**:89-96.
103. **Girn, J., M. Kavooosi, and J. Chantler.** 2002. Enhancement of coxsackievirus B3 infection by antibody to a different coxsackievirus strain. *J Gen Virol* **83**:351-8.
104. **Godeny, E. K., and C. J. Gauntt.** 1987. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol* **139**:913-8.
105. **Gomez, R. M., J. J. Lopez Costa, G. Pecci Saavedra, and M. I. Berria.** 1993. Ultrastructural study of cell injury induced by coxsackievirus B3 in pancreatic and cardiac tissues. *Medicina (B Aires)* **53**:300-6.
106. **Gozuacik, D., and A. Kimchi.** 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**:2891-906.

107. **Gras, G. S., and D. Dormont.** 1991. Antibody-dependent and antibody-independent complement-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection in a human, Epstein-Barr virus-transformed B-lymphocytic cell line. *J Virol* **65**:541-5.
108. **Green, D. R., and G. I. Evan.** 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**:19-30.
109. **Grist, N. R., E. J. Bell, and F. Assaad.** 1978. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* **24**:114-57.
110. **Guillon, C., M. Schutten, P. H. Boers, R. A. Gruters, and A. D. Osterhaus.** 2002. Antibody-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is determined by the structure of gp120 and depends on modulation of the gp120-CCR5 interaction. *J Virol* **76**:2827-34.
111. **Guthrie, M., P. A. Lodge, and S. A. Huber.** 1984. Cardiac injury in myocarditis induced by Coxsackievirus group B, type 3 in Balb/c mice is mediated by Lyt 2 + cytolytic lymphocytes. *Cell Immunol* **88**:558-67.
112. **Habermehl, K. O., and W. Diefenthal.** 1966. [The effect of virus infections on the course of cell division]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **199**:273-314.
113. **Hahn, E. A., V. L. Hartz, T. E. Moon, J. B. O'Connell, A. Herskowitz, B. M. McManus, and J. W. Mason.** 1995. The Myocarditis Treatment Trial: design, methods and patients enrollment. *Eur Heart J* **16 Suppl O**:162-7.
114. **Halstead, S. B.** 1980. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* **58**:1-21.
115. **Halstead, S. B.** 1979. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* **140**:527-33.
116. **Halstead, S. B.** 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* **42**:350-62.
117. **Halstead, S. B., S. Nimmannitya, and S. N. Cohen.** 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* **42**:311-28.
118. **Halstead, S. B., and E. J. O'Rourke.** 1977. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* **265**:739-41.
119. **Halstead, S. B., and E. J. O'Rourke.** 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* **146**:201-17.
120. **Halstead, S. B., E. J. O'Rourke, and A. C. Allison.** 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med* **146**:218-29.
121. **Hardt, S. E., and J. Sadoshima.** 2002. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* **90**:1055-63.
122. **Hashimoto, I., M. Tatsumi, and M. Nakagawa.** 1983. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of Coxsackie virus B3 heart disease. *Br J Exp Pathol* **64**:497-504.
123. **Hawkes, R. A.** 1964. Enhancement Of The Infectivity Of Arboviruses By Specific Antisera Produced In Domestic Fowls. *Aust J Exp Biol Med Sci* **42**:465-82.
124. **Hawkes, R. A., and K. J. Lafferty.** 1967. The enhancement of virus infectivity by antibody. *Virology* **33**:250-61.
125. **Heim, A., A. Canu, P. Kirschner, T. Simon, G. Mall, P. H. Hofschneider, and R. Kandolf.** 1992. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts. *J Infect Dis* **166**:958-65.
126. **Heim, A., and S. Weiss.** 2004. Interferons in enteroviral heart disease: modulation of cytokine expression and antiviral activity. *Med Microbiol Immunol* **193**:149-54.
127. **Hellen, C. U., and P. Sarnow.** 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**:1593-612.
128. **Henke, A., C. S. Chiang, R. Zell, and A. Stelzner.** 2004. Co-expression of interleukin-2 to increase the efficacy of DNA vaccine-mediated protection in coxsackievirus B3-infected mice. *Antiviral Res* **64**:131-6.
129. **Henke, A., S. Huber, A. Stelzner, and J. L. Whitton.** 1995. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* **69**:6720-8.
130. **Henke, A., N. Jarasch, U. Martin, R. Zell, and P. Wutzler.** 2008. Characterization of the protective capability of a recombinant coxsackievirus B3 variant expressing interferon-gamma. *Viral Immunol* **21**:38-48.
131. **Henke, A., N. Jarasch, and P. Wutzler.** 2008. Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Expert Rev Vaccines* **7**:1557-67.

132. **Henke, A., H. Launhardt, K. Klement, A. Stelzner, R. Zell, and T. Munder.** 2000. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* **74**:4284-90.
133. **Henke, A., C. Mohr, H. Sprenger, C. Graebner, A. Stelzner, M. Nain, and D. Gemsä.** 1992. Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL- 1 beta, and IL-6 in human monocytes. *J Immunol* **148**:2270-7.
134. **Henke, A., M. Nestler, S. Strunze, H. P. Saluz, P. Hortschansky, B. Menzel, U. Martin, R. Zell, A. Stelzner, and T. Munder.** 2001. The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology* **289**:15-22.
135. **Henke, A., E. Wagner, J. L. Whitton, R. Zell, and A. Stelzner.** 1998. Protection of mice against lethal coxsackievirus B3 infection by using DNA immunization. *J Virol* **72**:8327-31.
136. **Henke, A., R. Zell, G. Ehrlich, and A. Stelzner.** 2001. Expression of immunoregulatory cytokines by recombinant coxsackievirus B3 variants confers protection against virus-caused myocarditis. *J Virol* **75**:8187-94.
137. **Henke, A., R. Zell, U. Martin, and A. Stelzner.** 2003. Direct interferon-gamma-mediated protection caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Virology* **315**:335-44.
138. **Herskowitz, A., L. J. Wolfgam, N. R. Rose, and K. W. Beisel.** 1987. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: a pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains. *J Am Coll Cardiol* **9**:1311-9.
139. **Hia, C. P., W. C. Yip, B. C. Tai, and S. C. Quek.** 2004. Immunosuppressive therapy in acute myocarditis: an 18 year systematic review. *Arch Dis Child* **89**:580-4.
140. **Hober, D., W. Chehadeh, A. Bouzidi, and P. Wattré.** 2001. Antibody-dependent enhancement of coxsackievirus B4 infectivity of human peripheral blood mononuclear cells results in increased interferon-alpha synthesis. *J Infect Dis* **184**:1098-108.
141. **Hofschneider, P. H., K. Klingel, and R. Kandolf.** 1990. Toward understanding the pathogenesis of enterovirus-induced cardiomyopathy: molecular and ultrastructural approaches. *J Struct Biol* **104**:32-7.
142. **Hogle, J. M.** 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol* **56**:677-702.
143. **Hohdatsu, T., J. Tokunaga, and H. Koyama.** 1994. The role of IgG subclass of mouse monoclonal antibodies in antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection of feline macrophages. *Arch Virol* **139**:273-85.
144. **Holland, J. J.** 1961. Receptor affinities as major determinants of enterovirus tissue tropisms in humans. *Virology* **15**:312-26.
145. **Homsy, J., M. Meyer, M. Tateno, S. Clarkson, and J. A. Levy.** 1989. The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* **244**:1357-60.
146. **Hsu, Y. T., K. G. Wolter, and R. J. Youle.** 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3668-72.
147. **Hsu, Y. T., and R. J. Youle.** 1998. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* **273**:10777-83.
148. **Huang, Y., Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka, and H. Wu.** 2001. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* **104**:781-90.
149. **Huber, M., H. C. Selinka, and R. Kandolf.** 1997. Tyrosine phosphorylation events during coxsackievirus B3 replication. *J Virol* **71**:595-600.
150. **Huber, M., K. A. Watson, H. C. Selinka, C. M. Carthy, K. Klingel, B. M. McManus, and R. Kandolf.** 1999. Cleavage of RasGAP and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in the course of coxsackievirus B3 replication. *J Virol* **73**:3587-94.
151. **Huber, S., C. Shi, and R. C. Budd.** 2002. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *J Virol* **76**:6487-94.
152. **Huber, S. A.** 1997. Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice. *Lab Invest* **76**:691-701.
153. **Huber, S. A.** 2000. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **45**:579-87.
154. **Huber, S. A., C. J. Gauntt, and P. Sakkinen.** 1998. Enteroviruses and myocarditis: viral pathogenesis through replication, cytokine induction, and immunopathogenicity. *Adv Virus Res* **51**:35-80.

155. **Huber, S. A., D. Graveline, M. K. Newell, W. K. Born, and R. L. O'Brien.** 2000. V gamma 1+ T cells suppress and V gamma 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Immunol* **165**:4174-81.
156. **Huber, S. A., and L. P. Job.** 1983. Cellular immune mechanisms in Coxsackievirus group B, type 3 induced myocarditis in Balb/C mice. *Adv Exp Med Biol* **161**:491-508.
157. **Huber, S. A., and P. A. Lodge.** 1984. Coxsackievirus B-3 myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol* **116**:21-9.
158. **Huber, S. A., D. C. Lyden, and P. A. Lodge.** 1985. Immunopathogenesis of experimental Coxsackievirus induced myocarditis: role of autoimmunity. *Herz* **10**:1-7.
159. **Hufnagel, G., S. Pankuweit, A. Richter, U. Schonian, and B. Maisch.** 2000. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* **25**:279-85.
160. **Hunziker, I. P., C. T. Cornell, and J. L. Whitton.** 2007. Deletions within the 5'UTR of coxsackievirus B3: consequences for virus translation and replication. *Virology* **360**:120-8.
161. **Hunziker, I. P., S. Harkins, R. Feuer, C. T. Cornell, and J. L. Whitton.** 2004. Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. *Virology* **330**:196-208.
162. **Ito, M., M. Kodama, M. Masuko, M. Yamaura, K. Fuse, Y. Uesugi, S. Hirono, Y. Okura, K. Kato, Y. Hotta, T. Honda, R. Kuwano, and Y. Aizawa.** 2000. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* **86**:275-80.
163. **Itoh, N., and S. Nagata.** 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* **268**:10932-7.
164. **Jang, S. K., H. G. Krausslich, M. J. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg, and E. Wimmer.** 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* **62**:2636-43.
165. **Jarasch, N., U. Martin, E. Kamphausen, R. Zell, P. Wutzler, and A. Henke.** 2005. Interferon-gamma-induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Viral Immunol* **18**:355-64.
166. **Jenson, A. B., and H. S. Rosenberg.** 1984. Multiple viruses in diabetes mellitus. *Prog Med Virol* **29**:197-217.
167. **Jiang, X., and X. Wang.** 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**:87-106.
168. **Jin, O., M. J. Sole, J. W. Butany, W. K. Chia, P. R. McLaughlin, P. Liu, and C. C. Liew.** 1990. Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* **82**:8-16.
169. **Joachims, M., K. S. Harris, and D. Etchison.** 1995. Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* **211**:451-61.
170. **Joachims, M., P. C. Van Breugel, and R. E. Lloyd.** 1999. Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* **73**:718-27.
171. **Joklik, W.** 1990. Interferons. Raven Press, New York.
172. **Joo, C. H., H. N. Hong, E. O. Kim, J. O. Im, S. Y. Yoon, J. S. Ye, M. S. Moon, D. Kim, H. Lee, and Y. K. Kim.** 2003. Coxsackievirus B3 induces apoptosis in the early phase of murine myocarditis: a comparative analysis of cardiovirulent and noncardiovirulent strains. *Intervirology* **46**:135-40.
173. **Kandolf, R.** 1998. [Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy]. *Med Klin* **93**:215-22.
174. **Kandolf, R., K. Klingel, H. Mertsching, A. Canu, C. Hohenadl, R. Zell, B. Y. Reimann, A. Heim, B. M. McManus, A. K. Foulis, and et al.** 1991. Molecular studies on enteroviral heart disease: patterns of acute and persistent infections. *Eur Heart J* **12 Suppl D**:49-55.
175. **Kandolf, R., K. Klingel, R. Zell, H. C. Selinka, U. Raab, W. Schneider-Brachert, and B. Bultmann.** 1993. Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation. *Intervirology* **35**:140-51.
176. **Kandolf, R., M. Sauter, C. Aepinus, J. J. Schnorr, H. C. Selinka, and K. Klingel.** 1999. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res* **62**:149-58.

177. **Karnauchow, T. M., D. L. Tolson, B. A. Harrison, E. Altman, D. M. Lublin, and K. Dimock.** 1996. The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* **70**:5143-52.
178. **Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-57.
179. **Kim, K. S., N. M. Chapman, and S. Tracy.** 2008. Replication of coxsackievirus B3 in primary cell cultures generates novel viral genome deletions. *J Virol* **82**:2033-7.
180. **Kim, K. S., S. Tracy, W. Tapprich, J. Bailey, C. K. Lee, K. Kim, W. H. Barry, and N. M. Chapman.** 2005. 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J Virol* **79**:7024-41.
181. **Kim, S. M., J. H. Park, S. K. Chung, J. Y. Kim, H. Y. Hwang, K. C. Chung, I. Jo, S. I. Park, and J. H. Nam.** 2004. Coxsackievirus B3 infection induces *cyr61* activation via JNK to mediate cell death. *J Virol* **78**:13479-88.
182. **Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, and A. Ashkenazi.** 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* **276**:46639-46.
183. **Kishimoto, C., and W. H. Abelmann.** 1990. In vivo significance of T cells in the development of Coxsackievirus B3 myocarditis in mice. Immature but antigen-specific T cells aggravate cardiac injury. *Circ Res* **67**:589-98.
184. **Kishimoto, C., M. Kurokawa, and H. Ochiai.** 2002. Antibody-mediated immune enhancement in coxsackievirus B3 myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* **34**:1227-38.
185. **Klingel, K., C. Hohenadl, A. Canu, M. Albrecht, M. Seemann, G. Mall, and R. Kandolf.** 1992. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:314-8.
186. **Klingel, K., and R. Kandolf.** 1993. The role of enterovirus replication in the development of acute and chronic heart muscle disease in different immunocompetent mouse strains. *Scand J Infect Dis Suppl* **88**:79-85.
187. **Klingel, K., B. M. McManus, and R. Kandolf.** 1995. Enterovirus-infected immune cells of spleen and lymph nodes in the murine model of chronic myocarditis: a role in pathogenesis? *Eur Heart J* **16 Suppl O**:42-5.
188. **Klingel, K., P. Rieger, G. Mall, H. C. Selinka, M. Huber, and R. Kandolf.** 1998. Visualization of enteroviral replication in myocardial tissue by ultrastructural in situ hybridization: identification of target cells and cytopathic effects. *Lab Invest* **78**:1227-37.
189. **Klingel, K., S. Stephan, M. Sauter, R. Zell, B. M. McManus, B. Bultmann, and R. Kandolf.** 1996. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol* **70**:8888-95.
190. **Knowlton, K. U., E. S. Jeon, N. Berkley, R. Wessely, and S. Huber.** 1996. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol* **70**:7811-8.
191. **Kronvall, G., R. P. Messner, and R. C. Williams, Jr.** 1970. Immunochemical studies on the interaction between staphylococcal protein A and gamma-G globulin. *J Immunol* **105**:1353-9.
192. **Kühl, U., M. Pauschinger, P. L. Schwimmbeck, B. Seeberg, C. Lober, M. Noutsias, W. Poller, and H. P. Schultheiss.** 2003. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* **107**:2793-8.
193. **Kuwana, T., and D. D. Newmeyer.** 2003. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **15**:691-9.
194. **Kyto, V., A. Saraste, J. Fohlman, N. G. Ilback, H. Harvala, T. Vuorinen, and T. Hyypia.** 2002. Cardiomyocyte apoptosis after antiviral WIN 54954 treatment in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Scand Cardiovasc J* **36**:187-92.
195. **Laurence, J., A. Saunders, E. Early, and J. E. Salmon.** 1990. Human immunodeficiency virus infection of monocytes: relationship to Fc-gamma receptors and antibody-dependent viral enhancement. *Immunology* **70**:338-43.
196. **Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, and W. C. Earnshaw.** 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**:346-7.

197. **Leopold, P. L., R. L. Wendland, T. Vincent, and R. G. Crystal.** 2006. Neutralized adeno-virus-immune complexes can mediate effective gene transfer via an Fc receptor-dependent infection pathway. *J Virol* **80**:10237-47.
198. **Levi, G., S. Scalvini, M. Volterrani, S. Marangoni, G. Arosio, and A. Quadri.** 1988. Cocksackie virus heart disease: 15 years after. *Eur Heart J* **9**:1303-7.
199. **Levine, B., and J. Yuan.** 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**:2679-88.
200. **Levine, L., K. M. Cowan, A. G. Osler, and M. M. Mayer.** 1953. Studies on the role of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in complement fixation and immune hemolysis. I. Uptake of complement nitrogen by specific precipitates and its inhibition by ethylenediamine tetraacetate. *J Immunol* **71**:359-66.
201. **Levine, L., A. G. Osler, and M. M. Mayer.** 1953. Studies on the role of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in complement fixation and immune hemolysis. III. The respective roles of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in immune hemolysis. *J Immunol* **71**:374-9.
202. **Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan.** 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491-501.
203. **Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang.** 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when re-leased from mitochondria. *Nature* **412**:95-9.
204. **Li, Y., T. Peng, Y. Yang, C. Niu, L. C. Archard, and H. Zhang.** 2000. High prevalence of enteroviral genomic sequences in myocardium from cases of endemic cardiomyopathy (Keshan disease) in China. *Heart* **83**:696-701.
205. **Lim, B. K., J. H. Nam, C. O. Gil, S. H. Yun, J. H. Choi, D. K. Kim, and E. S. Jeon.** 2005. Cocksackievirus B3 replication is related to activation of the late extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal. *Virus Res* **113**:153-7.
206. **Lindberg, A. M., R. L. Crowell, R. Zell, R. Kandolf, and U. Pettersson.** 1992. Mapping of the RD phenotype of the Nancy strain of coxsackievirus B3. *Virus Res* **24**:187-96.
207. **Lindmark, R., K. Thoren-Tolling, and J. Sjoquist.** 1983. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods* **62**:1-13.
208. **Littaua, R., I. Kurane, and F. A. Ennis.** 1990. Human IgG Fc receptor II mediates anti-body-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* **144**:3183-6.
209. **Liu, P., K. Aitken, Y. Y. Kong, M. A. Opavsky, T. Martino, F. Dawood, W. H. Wen, I. Kozieradzki, K. Bachmaier, D. Straus, T. W. Mak, and J. M. Penninger.** 2000. The tyro-sine kinase p56lck is essential in coxsackievirus B3-mediated heart disease. *Nat Med* **6**:429-34.
210. **Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang.** 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**:147-57.
211. **Lonberg-Holm, K., R. L. Crowell, and L. Philipson.** 1976. Unrelated animal viruses share receptors. *Nature* **259**:679-81.
212. **Luo, H., B. Yanagawa, J. Zhang, Z. Luo, M. Zhang, M. Esfandiarei, C. Carthy, J. E. Wilson, D. Yang, and B. M. McManus.** 2002. Cocksackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol* **76**:3365-73.
213. **Luo, H., J. Zhang, C. Cheung, A. Suarez, B. M. McManus, and D. Yang.** 2003. Protea-some inhibition reduces coxsackievirus B3 replication in murine cardiomyocytes. *Am J Pathol* **163**:381-5.
214. **Luo, H., J. Zhang, F. Dastvan, B. Yanagawa, M. A. Reidy, H. M. Zhang, D. Yang, J. E. Wilson, and B. M. McManus.** 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis of cyclin D1 is asso-ciated with coxsackievirus-induced cell growth arrest. *J Virol* **77**:1-9.
215. **Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang.** 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**:481-90.
216. **Maisch, B.** 1998. [Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force--more questions than answers?]. *Med Klin* **93**:199-209.
217. **Maisch, B., G. Hufnagel, U. Schonian, and C. Hengstenberg.** 1995. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Disease (ESETCID). *Eur Heart J* **16 Suppl O**:173-5.
218. **Makarov, V. A., O. B. Riabova, V. G. Granik, P. Wutzler, and M. Schmidtke.** 2005. Novel [(biphenyloxy)propyl]isoxazole derivatives for inhibition of human rhinovirus 2 and coxsackievirus B3 replication. *J Antimicrob Chemother* **55**:483-8.

219. **Martin, U., N. Jarasch, M. Nestler, A. Rassmann, T. Munder, S. Seitz, R. Zell, P. Wutzler, and A. Henke.** 2007. Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3. *Apoptosis in print*.
220. **Martin, U., M. Nestler, T. Munder, R. Zell, H. H. Sigusch, and A. Henke.** 2004. Characterization of coxsackievirus B3-caused apoptosis under in vitro conditions. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **193**:133-9.
221. **Martino, T.** 1995. Enteroviral myokaditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies. In: Rotbart HA Human enterovirus infections. ASM Press, Washington D. C.
222. **Martino, T. A., P. Liu, and M. J. Sole.** 1994. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **74**:182-8.
223. **Mason, J. W., J. B. O'Connell, A. Herskowitz, N. R. Rose, B. M. McManus, M. E. Billingham, and T. E. Moon.** 1995. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* **333**:269-75.
224. **Mason, P. W., B. Baxt, F. Brown, J. Harber, A. Murdin, and E. Wimmer.** 1993. Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology* **192**:568-77.
225. **Matsumori, A., N. Tomioka, and C. Kawai.** 1988. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Am Heart J* **115**:1229-32.
226. **Matteucci, D., M. Paglianti, A. M. Giangregorio, M. R. Capobianchi, F. Dianzani, and M. Bendinelli.** 1985. Group B coxsackieviruses readily establish persistent infections in human lymphoid cell lines. *J Virol* **56**:651-4.
227. **McManus, B. M., L. H. Chow, J. E. Wilson, D. R. Anderson, J. M. Gulizia, C. J. Gauntt, K. E. Klingel, K. W. Beisel, and R. Kandolf.** 1993. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* **68**:159-69.
228. **Melnick, J. L.** 1962. Virus susceptibility of mammalian cells. *Med Bull (Ann Arbor)* **28**:321-6.
229. **Melnick, J. L., and G. C. Godman.** 1951. Pathogenesis of coxsackie virus infection; multiplication of virus and evolution of the muscle lesion in mice. *J Exp Med* **93**:247-66.
230. **Melnick, J. L., E. W. Shaw, and E. C. Curen.** 1949. A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **71**:344-9.
231. **Mena, I., C. Fischer, J. R. Gebhard, C. M. Perry, S. Harkins, and J. L. Whitton.** 2000. Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology. *Virology* **271**:276-88.
232. **Mena, I., C. M. Perry, S. Harkins, F. Rodriguez, J. Gebhard, and J. L. Whitton.** 1999. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol* **155**:1205-15.
233. **Milstone, A. M., J. Petrella, M. D. Sanchez, M. Mahmud, J. C. Whitbeck, and J. M. Bergelson.** 2005. Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J Virol* **79**:655-60.
234. **Misbah, S. A., G. P. Spickett, P. C. Ryba, J. M. Hockaday, J. S. Kroll, C. Sherwood, J. B. Kurtz, E. R. Moxon, and H. M. Chapel.** 1992. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemia: case report and literature review. *J Clin Immunol* **12**:266-70.
235. **Modlin, J. F., and M. Bowman.** 1987. Perinatal transmission of coxsackievirus B3 in mice. *J Infect Dis* **156**:21-5.
236. **Modrow, S.** 2003. Molekulare Virologie, vol. 2. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
237. **Muckelbauer, J. K., M. Kremer, I. Minor, G. Diana, F. J. Dutko, J. Groarke, D. C. Pevear, and M. G. Rossmann.** 1995. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure* **3**:653-67.
238. **Muller-Eberhard, H. J., and O. Gotze.** 1972. C3 proactivator convertase and its mode of action. *J Exp Med* **135**:1003-8.
239. **Nalbantoglu, J., G. Pari, G. Karpati, and P. C. Holland.** 1999. Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum Gene Ther* **10**:1009-19.

240. **Neu, N., S. W. Craig, N. R. Rose, F. Alvarez, and K. W. Beisel.** 1987. Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus. *Clin Exp Immunol* **69**:566-74.
241. **Neu, N., R. Klieber, M. Fruhwirth, and P. Berger.** 1991. Cardiac myosin-induced myocarditis as a model of postinfectious autoimmunity. *Eur Heart J* **12 Suppl D**:117-20.
242. **Neu, N., B. Ploier, and C. Ofner.** 1990. Cardiac myosin-induced myocarditis. Heart autoantibodies are not involved in the induction of the disease. *J Immunol* **145**:4094-100.
243. **Neu, N., C. Pummerer, T. Rieker, and P. Berger.** 1993. T cells in cardiac myosin-induced myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* **68**:107-10.
244. **Nicholson-Weller, A., and L. B. Klickstein.** 1999. C1q-binding proteins and C1q receptors. *Curr Opin Immunol* **11**:42-6.
245. **Nicholson, D. W.** 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**:1028-42.
246. **Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch.** 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* **24**:19-28.
247. **Norris, C. M., P. G. Danis, and T. D. Gardner.** 1999. Aseptic meningitis in the newborn and young infant. *Am Fam Physician* **59**:2761-70.
248. **Noutsias, M., H. Fechner, H. de Jonge, X. Wang, D. Dekkers, A. B. Houtsmuller, M. Pauschinger, J. Bergelson, R. Warraich, M. Yacoub, R. Hetzer, J. Lamers, H. P. Schultheiss, and W. Poller.** 2001. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins α(v)β(3) and α(v)β(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* **104**:275-80.
249. **Novak, J. E., and K. Kirkegaard.** 1991. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **65**:3384-7.
250. **O'Connel, J.** 1987. The role of myokaditis in end-state dilated cardiomyopathy. *Tex. Heart. Inst. J* **14**:268-275.
251. **Ochiai, H., M. Kurokawa, K. Hayashi, and S. Niwayama.** 1988. Antibody-mediated growth of influenza A NWS virus in macrophagelike cell line P388D1. *J Virol* **62**:20-6.
252. **Ohlmann, T., M. Rau, V. M. Pain, and S. J. Morley.** 1996. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *Embo J* **15**:1371-82.
253. **Olivetti, G., R. Abbi, F. Quaini, J. Kajstura, W. Cheng, J. A. Nitahara, E. Quaini, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, S. Krajewski, J. C. Reed, and P. Anversa.** 1997. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* **336**:1131-41.
254. **Opavsky, M. A., T. Martino, M. Rabinovitch, J. Penninger, C. Richardson, M. Petric, C. Trinidad, L. Butcher, J. Chan, and P. P. Liu.** 2002. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest* **109**:1561-9.
255. **Opavsky, M. A., T. Martino, M. Rabinovitch, J. Penninger, C. Richardson, M. Petric, C. Trinidad, L. Butcher, J. Chan, and P. P. Liu.** 2002. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest* **109**:1561-9.
256. **Orthopoulos, G., K. Triantafilou, and M. Triantafilou.** 2004. Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells. *J Med Virol* **74**:291-9.
257. **Palmer, P., B. Charley, B. Rombaut, M. Daeron, and P. Lebon.** 2000. Antibody-dependent induction of type I interferons by poliovirus in human mononuclear blood cells requires the type II fcγ receptor (CD32). *Virology* **278**:86-94.
258. **Peiris, J. S., S. Gordon, J. C. Unkeless, and J. S. Porterfield.** 1981. Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. *Nature* **289**:189-91.
259. **Peiris, J. S., and J. S. Porterfield.** 1979. Antibody-mediated enhancement of Flavivirus replication in macrophage-like cell lines. *Nature* **282**:509-11.
260. **Pelletier, J., G. Kaplan, V. R. Racaniello, and N. Sonenberg.** 1988. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol* **8**:1103-12.
261. **Pelletier, J., and N. Sonenberg.** 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**:320-5.
262. **Piguet, P. F., C. D. Kan, and C. Vesin.** 2002. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* **7**:91-8.

263. **Prather, S. L., R. Dagan, J. A. Jenista, and M. A. Menegus.** 1984. The isolation of enteroviruses from blood: a comparison of four processing methods. *J Med Virol* **14**:221-7.
264. **Prindull, G.** 1995. Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer* **31A**:116-23.
265. **Ramsingh, A., J. Slack, J. Silkworth, and A. Hixson.** 1989. Severity of disease induced by a pancreatropic Coxsackie B4 virus correlates with the H-2Kq locus of the major histocompatibility complex. *Virus Res* **14**:347-58.
266. **Reed, L. a. M., H.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer J Hyg* **27**:493-497.
267. **Renatus, M., H. R. Stennicke, F. L. Scott, R. C. Liddington, and G. S. Salvesen.** 2001. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14250-5.
268. **Riecan sky, I., Z. Schreinerova, A. Egnerova, A. Petrovicova, and O. Bzduchova.** 1989. Incidence of Coxsackie virus infection in patients with dilated cardiomyopathy. *Cor Vasa* **31**:225-30.
269. **Riedl, S. J., M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S. W. Fesik, R. C. Liddington, and G. S. Salvesen.** 2001. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**:791-800.
270. **Robinson, W. E., Jr., D. C. Montefiori, and W. M. Mitchell.** 1988. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* **1**:790-4.
271. **Robinson, W. E., Jr., D. C. Montefiori, and W. M. Mitchell.** 1990. Complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection requires CD4 and complement receptors. *Virology* **175**:600-4.
272. **Roelvink, P. W., A. Lizonova, J. G. Lee, Y. Li, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, D. E. Brough, I. Kovesdi, and T. J. Wickham.** 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* **72**:7909-15.
273. **Romero, J. R.** 2001. Pleconaril: a novel antipicornaviral drug. *Expert Opin Investig Drugs* **10**:369-79.
274. **Rossmann, M. G.** 1989. The canyon hypothesis. *Viral Immunol* **2**:143-61.
275. **Rossmann, M. G.** 1989. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* **264**:14587-90.
276. **Rupinder, S. K., A. K. Gurpreet, and S. Manjeet.** 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* **46**:383-93.
277. **Saraste, A., A. Arola, T. Vuorinen, V. Kyto, M. Kallajoki, K. Pulkki, L. M. Voipio-Pulkki, and T. Hyypia.** 2003. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* **12**:255-62.
278. **Sauter, P., P. E. Lobert, B. Lucas, R. Varela-Calvino, G. Alm, P. Wattré, and D. Hober.** 2007. Role of the capsid protein VP4 in the plasma-dependent enhancement of the Coxsackievirus B4E2-infection of human peripheral blood cells. *Virus Res* **125**:183-90.
279. **Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**:1675-87.
280. **Schlesinger, J. J., and M. W. Brandriss.** 1983. 17D yellow fever virus infection of P388D1 cells mediated by monoclonal antibodies: properties of the macrophage Fc receptor. *J Gen Virol* **64 (Pt 6)**:1255-62.
281. **Schlesinger, J. J., and M. W. Brandriss.** 1981. Antibody-mediated infection of macrophages and macrophage-like cell lines with 17D-yellow fever virus. *J Med Virol* **8**:103-17.
282. **Schlesinger, J. J., and M. W. Brandriss.** 1981. Growth of 17D yellow fever virus in a macrophage-like cell line, U937: role of Fc and viral receptors in antibody-mediated infection. *J Immunol* **127**:659-65.
283. **Schmidtke, M., E. Hammerschmidt, S. Schuler, R. Zell, E. Birch-Hirschfeld, V. A. Makarov, O. B. Riabova, and P. Wutzler.** 2005. Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment. *J Antimicrob Chemother* **56**:648-56.
284. **Schmidtke, M., P. Wutzler, R. Zieger, O. B. Riabova, and V. A. Makarov.** 2009. New pleconaril and [(biphenyloxy)propyl]isoxazole derivatives with substitutions in the central ring exhibit antiviral activity against pleconaril-resistant coxsackievirus B3. *Antiviral Res* **81**:56-63.

285. **Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, H. C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C. H. Fox, N. P. Salzman, and A. S. Fauci.** 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305-8.
286. **Schnurr, D. P., and N. J. Schmidt.** 1984. Persistent infection of mouse fibroblasts with Cocksackievirus. *Arch Virol* **81**:91-101.
287. **Schotte, P., W. Declercq, S. Van Huffel, P. Vandenabeele, and R. Beyaert.** 1999. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* **442**:117-21.
288. **Schultheiss, H. P., M. Pauschinger, and U. Kuhl.** 1998. [Pathogenesis of inflammatory cardiomyopathies]. *Med Klin (Munich)* **93**:229-35.
289. **Schutten, M., A. C. Andeweg, G. F. Rimmelzwaan, and A. D. Osterhaus.** 1997. Modulation of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated entry by human antibodies. *J Gen Virol* **78** (Pt 5):999-1006.
290. **Scorrano, L., and S. J. Korsmeyer.** 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:437-44.
291. **See, D. M., and J. G. Tilles.** 1994. Efficacy of a polyvalent inactivated-virus vaccine in protecting mice from infection with clinical strains of group B coxsackieviruses. *Scand J Infect Dis* **26**:739-47.
292. **See, D. M., and J. G. Tilles.** 1997. Occurrence of coxsackievirus hepatitis in baby rabbits and protection by a formalin-inactivated polyvalent vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med* **216**:52-6.
293. **Seery, J. P., V. Cattell, and F. M. Watt.** 2001. Cutting edge: amelioration of kidney disease in a transgenic mouse model of lupus nephritis by administration of the caspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(beta-o-methyl)-fluoromethylketone. *J Immunol* **167**:2452-5.
294. **Seki, Y., H. Kai, M. Kai, A. Muraishi, K. Adachi, and T. Imaizumi.** 1998. Myocardial DNA strand breaks are detected in biopsy tissues from patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol* **21**:591-6.
295. **Seko, Y., H. Matsuda, K. Kato, Y. Hashimoto, H. Yagita, K. Okumura, and Y. Yazaki.** 1993. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Clin Invest* **91**:1327-36.
296. **Seko, Y., Y. Shinkai, A. Kawasaki, H. Yagita, K. Okumura, F. Takaku, and Y. Yazaki.** 1991. Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation* **84**:788-95.
297. **Seko, Y., N. Takahashi, H. Yagita, K. Okumura, and Y. Yazaki.** 1997. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol* **183**:105-8.
298. **Seko, Y., H. Tsuchimochi, T. Nakamura, K. Okumura, S. Naito, K. Imataka, J. Fujii, F. Takaku, and Y. Yazaki.** 1990. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Cocksackievirus B3. *Circ Res* **67**:360-7.
299. **Shafren, D. R., R. C. Bates, M. V. Agrez, R. L. Herd, G. F. Burns, and R. D. Barry.** 1995. Cocksackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol* **69**:3873-7.
300. **Shafren, D. R., D. T. Williams, and R. D. Barry.** 1997. A decay-accelerating factor-binding strain of coxsackievirus B3 requires the coxsackievirus-adenovirus receptor protein to mediate lytic infection of rhabdomyosarcoma cells. *J Virol* **71**:9844-8.
301. **Sharma, R., S. Raychaudhuri, and A. Dasgupta.** 2004. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **320**:195-205.
302. **Shieh, J. T., and J. M. Bergelson.** 2002. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J Virol* **76**:9474-80.
303. **Si, X., G. Gao, J. Wong, Y. Wang, J. Zhang, and H. Luo.** 2008. Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3. *PLoS ONE* **3**:e2585.
304. **Si, X., H. Luo, A. Morgan, J. Zhang, J. Wong, J. Yuan, M. Esfandiarei, G. Gao, C. Cheung, and B. M. McManus.** 2005. Stress-activated protein kinases are involved in coxsackievirus B3 viral progeny release. *J Virol* **79**:13875-81.
305. **Si, X., B. M. McManus, J. Zhang, J. Yuan, C. Cheung, M. Esfandiarei, A. Suarez, A. Morgan, and H. Luo.** 2005. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* **79**:8014-23.

306. **Si, X., Y. Wang, J. Wong, J. Zhang, B. M. McManus, and H. Luo.** 2007. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system by curcumin suppresses coxsackievirus B3 replication. *J Virol* **81**:3142-50.
307. **Slee, E. A., M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green, and S. J. Martin.** 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**:281-92.
308. **Slifka, M. K., R. Pagarigan, I. Mena, R. Feuer, and J. L. Whitton.** 2001. Using recombinant coxsackievirus B3 to evaluate the induction and protective efficacy of CD8+ T cells during picornavirus infection. *J Virol* **75**:2377-87.
309. **Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin.** 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**:959-62.
310. **Snapper, C. M., F. R. Rosas, P. Zelazowski, M. A. Moorman, M. R. Kehry, R. Bravo, and F. Weih.** 1996. B cells lacking RelB are defective in proliferative responses, but undergo normal B cell maturation to Ig secretion and Ig class switching. *J Exp Med* **184**:1537-41.
311. **Spear, G. T., C. Y. Ou, H. A. Kessler, J. L. Moore, G. Schochetman, and A. L. Landay.** 1990. Analysis of lymphocytes, monocytes, and neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons for HIV DNA. *J Infect Dis* **162**:1239-44.
312. **Sullivan, N., Y. Sun, J. Binley, J. Lee, C. F. Barbas, 3rd, P. W. Parren, D. R. Burton, and J. Sodroski.** 1998. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies. *J Virol* **72**:6332-8.
313. **Susin, S. A., E. Dugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw, and G. Kroemer.** 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**:571-80.
314. **Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebbersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer.** 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**:441-6.
315. **Sutton, G.** 1967. Cocksackie B4 myokarditis in an adult: successful isolation of virus from ventricular myokardium. *Clin Aviation Aerospace Med* **38**:66.
316. **Szopa, T. M., P. A. Titchener, N. D. Portwood, and K. W. Taylor.** 1993. Diabetes mellitus due to viruses--some recent developments. *Diabetologia* **36**:687-95.
317. **Takada, A., H. Feldmann, T. G. Ksiazek, and Y. Kawaoka.** 2003. Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J Virol* **77**:7539-44.
318. **Takada, A., and Y. Kawaoka.** 2003. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol* **13**:387-98.
319. **Takada, A., S. Watanabe, K. Okazaki, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2001. Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **75**:2324-30.
320. **Takada, H., C. Kishimoto, and Y. Hiraoka.** 1995. Therapy with immunoglobulin suppresses myocarditis in a murine coxsackievirus B3 model. Antiviral and anti-inflammatory effects. *Circulation* **92**:1604-11.
321. **Takeda, A., C. U. Tuazon, and F. A. Ennis.** 1988. Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science* **242**:580-3.
322. **Tam, P. E., and R. P. Messner.** 1999. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J Virol* **73**:10113-21.
323. **Tam, P. E., A. M. Schmidt, S. R. Ytterberg, and R. P. Messner.** 1991. Viral persistence during the developmental phase of Cocksackievirus B1-induced murine polymyositis. *J Virol* **65**:6654-60.
324. **Tamura, M., R. G. Webster, and F. A. Ennis.** 1991. Antibodies to HA and NA augment uptake of influenza A viruses into cells via Fc receptor entry. *Virology* **182**:211-9.
325. **Tang, D., J. M. Lahti, and V. J. Kidd.** 2000. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **275**:9303-7.
326. **Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong, and D. V. Goeddel.** 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**:845-53.

327. **Tewari, M., L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit.** 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**:801-9.
328. **Thompson, C. B.** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**:1456-62.
329. **Thorburn, A.** 2008. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* **13**:1-9.
330. **Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik.** 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-6.
331. **Tirado, S. M., and K. J. Yoon.** 2003. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol* **16**:69-86.
332. **Tomioka, N., C. Kishimoto, A. Matsumori, and C. Kawai.** 1986. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* **7**:868-72.
333. **Tomko, R. P., C. B. Johansson, M. Totrov, R. Abagyan, J. Frisen, and L. Philipson.** 2000. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res* **255**:47-55.
334. **Tomko, R. P., R. Xu, and L. Philipson.** 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3352-6.
335. **Towbin, J. A.** 2001. Myocarditis and pericarditis in adolescents. *Adolesc Med* **12**:47-67.
336. **Toyozaki, T., M. Hiroe, T. Saito, Y. Iijima, H. Takano, K. Hiroshima, H. Kohno, S. Ishiyama, F. Marumo, Y. Masuda, and H. Ohwada.** 1998. Levels of soluble Fas in patients with myocarditis, heart failure of unknown origin, and in healthy volunteers. *Am J Cardiol* **81**:798-800.
337. **Tracy, S.** 1997. The Coxsackie B Viruses. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
338. **Tracy, S., Z. Tu, N. Chapman, and G. Hufnagel.** 1995. Genetics of coxsackievirus B3 cardiovirulence. *Eur Heart J* **16 Suppl O**:15-7.
339. **Tremblay, M., S. Meloche, R. P. Sekaly, and M. A. Wainberg.** 1990. Complement receptor 2 mediates enhancement of human immunodeficiency virus 1 infection in Epstein-Barr virus-carrying B cells. *J Exp Med* **171**:1791-6.
340. **Trischmann, H., D. Davis, and P. J. Lachmann.** 1995. Lymphocytotropic strains of HIV type 1 when complexed with enhancing antibodies can infect macrophages via Fc gamma RIII, independently of CD4. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**:343-52.
341. **Tschopp, J., M. Irmeler, and M. Thome.** 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**:552-8.
342. **Tsujimoto, Y., and S. Shimizu.** 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**:1528-34.
343. **Van Houten, N., and S. A. Huber.** 1989. Role of cytotoxic T cells in experimental myocarditis. *Springer Semin Immunopathol* **11**:61-8.
344. **van Kuppeveld, F. J., A. S. de Jong, W. J. Melchers, and P. H. Willems.** 2005. Enterovirus protein 2B po(u)res out the calcium: a viral strategy to survive? *Trends Microbiol* **13**:41-4.
345. **van Kuppeveld, F. J., J. G. Hoenderop, R. L. Smeets, P. H. Willems, H. B. Dijkman, J. M. Galama, and W. J. Melchers.** 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J* **16**:3519-32.
346. **Verstrepen, W. A., S. Kuhn, M. M. Kockx, M. E. Van De Vyvere, and A. H. Mertens.** 2001. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* **39**:4093-6.
347. **Vuorinen, T., R. Vainionpaa, J. Heino, and T. Hyypia.** 1999. Enterovirus receptors and virus replication in human leukocytes. *J Gen Virol* **80 (Pt 4)**:921-7.
348. **Vuorinen, T., R. Vainionpaa, H. Kettinen, and T. Hyypia.** 1994. Coxsackievirus B3 infection in human leukocytes and lymphoid cell lines. *Blood* **84**:823-9.
349. **Vuorinen, T., R. Vainionpaa, R. Vanharanta, and T. Hyypia.** 1996. Susceptibility of human bone marrow cells and hematopoietic cell lines to coxsackievirus B3 infection. *J Virol* **70**:9018-23.
350. **Walport, M. J.** 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* **344**:1058-66.
351. **Walport, M. J.** 2001. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* **344**:1140-4.

352. **Wang, J., H. J. Chun, W. Wong, D. M. Spencer, and M. J. Lenardo.** 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13884-8.
353. **Wang, J. P., D. R. Asher, M. Chan, E. A. Kurt-Jones, and R. W. Finberg.** 2007. Cutting Edge: Antibody-mediated TLR7-dependent recognition of viral RNA. *J Immunol* **178**:3363-7.
354. **Wang, S.** 1998. Fatal coxsackievirus B infection in early infancy characterized by fulminant hepatitis. *J Infect* **37**:270.
355. **Wang, X.** 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**:2922-33.
356. **Ward, C. D., M. A. Stokes, and J. B. Flanagan.** 1988. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol* **62**:558-62.
357. **Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer.** 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727-30.
358. **Weidman, M. K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai, and A. Dasgupta.** 2003. The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res* **95**:75-85.
359. **Wessely, R., Henke, A., Zell, R., Kandolf, R. und Knowlton, K.** 1998. Low level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytophatic effect in culture. An approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation* **98**.
360. **Wessely, R., K. Klingel, K. U. Knowlton, and R. Kandolf.** 2001. Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation* **103**:756-61.
361. **Wessely, R., K. Klingel, L. F. Santana, N. Dalton, M. Hongo, W. Jonathan Lederer, R. Kandolf, and K. U. Knowlton.** 1998. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* **102**:1444-53.
362. **Whitton, J. L., C. T. Cornell, and R. Feuer.** 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**:765-76.
363. **Whitton, J. L., and R. Feuer.** 2004. Myocarditis, microbes and autoimmunity. *Autoimmunity* **37**:375-86.
364. **Wieder, T., F. Essmann, A. Prokop, K. Schmelz, K. Schulze-Osthoff, R. Beyaert, B. Dorken, and P. T. Daniel.** 2001. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* **97**:1378-87.
365. **Willis, S. N., and J. M. Adams.** 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**:617-25.
366. **Wolfgram, L. J., K. W. Beisel, A. Herskowitz, and N. R. Rose.** 1986. Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice. *J Immunol* **136**:1846-52.
367. **Wolfgram, L. J., K. W. Beisel, and N. R. Rose.** 1985. Heart-specific autoantibodies following murine coxsackievirus B3 myocarditis. *J Exp Med* **161**:1112-21.
368. **Wong, C. Y., J. J. Woodruff, and J. F. Woodruff.** 1977. Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B-3 infection. I. Model and viral specificity1. *J Immunol* **118**:1159-64.
369. **Woodruff, J. F.** 1980. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol* **101**:425-84.
370. **Woodruff, J. F., and J. J. Woodruff.** 1974. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol* **113**:1726-34.
371. **Yalamanchili, P., U. Datta, and A. Dasgupta.** 1997. Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3Cpro. *J Virol* **71**:1220-6.
372. **Yalamanchili, P., K. Harris, E. Wimmer, and A. Dasgupta.** 1996. Inhibition of basal transcription by poliovirus: a virus- encoded protease (3Cpro) inhibits formation of TBP-TATA box complex in vitro. *J Virol* **70**:2922-9.
373. **Yalamanchili, P., K. Weidman, and A. Dasgupta.** 1997. Cleavage of transcriptional activator Oct-1 by poliovirus encoded protease 3Cpro. *Virology* **239**:176-85.
374. **Ylipaasto, P., K. Klingel, A. M. Lindberg, T. Otonkoski, R. Kandolf, T. Hovi, and M. Roivainen.** 2004. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia* **47**:225-39.
375. **Yoon, J. W., M. Austin, T. Onodera, and A. L. Notkins.** 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* **300**:1173-9.

376. **Ytterberg, S. R., M. L. Mahowald, and R. P. Messner.** 1988. T cells are required for coxsackievirus B1 induced murine polymyositis. *J Rheumatol* **15**:475-8.
377. **Yu, L., F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E. H. Baehrecke, and M. Leonardo.** 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4952-7.
378. **Yuan, J., J. Zhang, B. W. Wong, X. Si, J. Wong, D. Yang, and H. Luo.** 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β suppresses coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via stabilization of beta-catenin. *Cell Death Differ* **12**:1097-106.
379. **Yuan, J. P., W. Zhao, H. T. Wang, K. Y. Wu, T. Li, X. K. Guo, and S. Q. Tong.** 2003. Cocksackievirus B3-induced apoptosis and caspase-3. *Cell Res* **13**:203-9.
380. **Zamzami, N., and G. Kroemer.** 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:67-71.
381. **Zaragoza, C., C. J. Ocampo, M. Saura, C. Bao, M. Leppo, A. Lafond-Walker, D. R. Thiemann, R. Hruban, and C. J. Lowenstein.** 1999. Inducible nitric oxide synthase protection against coxsackievirus pancreatitis. *J Immunol* **163**:5497-504.
382. **Zautner, A. E., B. Jahn, E. Hammerschmidt, P. Wutzler, and M. Schmidtke.** 2006. N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells. *J Virol* **80**:6629-36.
383. **Zautner, A. E., U. Korner, A. Henke, C. Badorff, and M. Schmidtke.** 2003. Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J Virol* **77**:10071-7.
384. **Zeichhardt, H., J. R. Schlehofer, K. Wetz, H. Hampl, and K. O. Habermehl.** 1982. Mouse Elberfeld (ME) virus determines the cell surface alterations when mixedly infecting poliovirus-infected cells. *J Gen Virol* **58**:417-28.
385. **Zhang, H., P. Morgan-Capner, N. Latif, Y. A. Pandolfino, W. Fan, M. J. Dunn, and L. C. Archard.** 1997. Cocksackievirus B3-induced myocarditis. Characterization of stable attenuated variants that protect against infection with the cardiovirulent wild-type strain. *Am J Pathol* **150**:2197-207.
386. **Zhang, H. M., J. Yuan, P. Cheung, H. Luo, B. Yanagawa, D. Chau, N. Stephan-Tozy, B. W. Wong, J. Zhang, J. E. Wilson, B. M. McManus, and D. Yang.** 2003. Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J Biol Chem* **278**:33011-9.
387. **Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang.** 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**:11549-56.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena angefertigt.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. P. Wutzler als Leiter der Einrichtung für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können.

Ganz besonders und von ganzem Herzen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Andreas Henke bedanken, der mir über all die Jahre ein wirklich außergewöhnlicher Doktorvater war. Bei allen Erfolgen und Problemen stand er mir stets zur Seite und gab mir die Möglichkeit zu lernen und mich weiter zu entwickeln. Seine Geduld, sein Optimismus und seine warmherzige Art haben mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich stark geprägt und waren die Basis für das Gelingen dieser Arbeit.

Mein Dank geht ebenso an die von ihm geleitete Arbeitsgruppe mit Heike Urban und allen (ehemaligen) Nachwuchswissenschaftlern, die eine außergewöhnliche Atmosphäre geschaffen haben, in der ich mich immer wohl gefühlt habe, viele schöne Momente erleben durfte und ein Teil derer ich wirklich gerne war. Insbesondere und ganz herzlich danke ich Nadine Wiesener für die tägliche praktische und persönliche Unterstützung.

Zudem möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit bedanken, vor allem aber bei Herrn Dr. E. Birsch-Hirschfeld für die Synthese der benötigten Primer, Frau V. Güntzschel sowie Herrn Dr. M. Schacke für die stets schnelle Bereitstellung der Zellkulturen und Frau PD Dr. Michaela Schmidtke sowie Herrn PD Dr. Roland Zell und ihren Arbeitsgruppen für die Kooperation und hilfreichen Hinweise bei kleinen und großen experimentellen Problemen.

Herrn Prof. Dr. Falk Weih und Arbeitsgruppe (Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut eV in Jena) danke ich für die Durchführung der Durchflusszytometrie-Analysen.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an Dr. Ulrike Martin, von der ich in den ersten Jahren viele praktische Dinge lernen durfte und die mir eine liebe Freundin geworden ist.

Ganz besonders liegt es mir aber am Herzen, mich an dieser Stelle bei Daniel Althof für seine geduldige Unterstützung und Motivation, seine Liebe, Geborgenheit und sein Vertrauen in den gemeinsamen letzten 14 Jahren zu bedanken.

Eine „Danke“ auch an meine Geschwister Alexander Jarasch und Katja Bähr & Familie, die mir in allen Lebenslagen zu Seite standen.

Thesen zur Dissertation

von Diplom-Biologin Nadine Jarasch

Experimentelle Coxsackievirus B3-Infektion primärer muriner und humaner CD19⁺ B-Lymphozyten

Trotz der sehr gut charakterisierten molekularbiologischen Eigenschaften von Coxsackievirus B3 (CVB3), ist die Pathogenese der durch diesen Erreger induzierten Infektionen noch weitestgehend ungeklärt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von CVB3 mit Zellen des Immunsystems und dabei im Speziellen mit primären murinen und humanen CD19⁺ B-Lymphozyten sowohl unter *In vitro*- als auch unter *In vivo*-Bedingungen untersucht.

1. Nach der *In vitro*-Infektion muriner und humaner CD19⁺ B-Lymphozyten wurde erstmals nachgewiesen, dass CVB3 aktiv in diesen Immunzellen repliziert, wobei offenbar nur ein geringer Prozentsatz der Lymphozyten empfänglich für das Virus ist.
2. Eine Expression des normalerweise für die Internalisierung von CVB3 verantwortlichen Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) konnte bei murinen CD19⁺ Milz-B-Lymphozyten nicht detektiert werden. Für primäre humane B-Zellen des peripheren Blutes war ein Nachweis von CAR nur auf Transkriptionsebene möglich.
3. In Anwesenheit eines virusspezifischen Anti-Serums wurde bereits kurz nach Infektionsbeginn sowohl bei murinen als auch bei humanen CD19⁺ B-Lymphozyten eine schnelle Virusaufnahme beobachtet, die 2 h p. i. zu signifikant gesteigerten intrazellulären Partikelkonzentrationen führte.
4. Durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des verwendeten Anti-CVB3-Serums bzw. einer Behandlung mit Fc-bindendem Protein A konnte eine Beteiligung von Antikörpern an dieser verstärkten Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Zellen belegt werden.

5. Dabei wies das verwendete Anti-CVB3-Serum in der eingesetzten Verdünnungsstufe zwar eine deutliche Fähigkeit auf, Virusantigene zu erkennen, zeigte jedoch nur eine geringe virusneutralisierende Wirkung, was eher auf eine Beteiligung nicht neutralisierender Antikörper an der gesteigerten CVB3-Infektiosität für murine CD19⁺ B-Zellen hindeutet.
6. Da es weder durch den Einsatz eines Antikörpers gegen die zellulären Fcγ-Rezeptoren FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16) noch durch die Anwendung eines kommerziellen Fc-Rezeptor-Blockierungsreagenz möglich war, die Antikörper-vermittelte Virusaufnahme in murine CD19⁺ B-Lymphozyten zu hemmen, ist eine Beteiligung dieser Rezeptoren eher unwahrscheinlich.
7. Ein Komplement-inaktivierendes Erhitzen des murinen Anti-CVB3-Serums führte zu einer signifikanten Reduktion des Antikörper-abhängigen Viruseintritts in CD19⁺ B-Zellen.
8. Die Aufnahme infektiöser Viruspartikel ins Zellinnere muriner CD19⁺ Milz-B-Zellen war ebenfalls deutlich gesteigert, wenn diese durch die Behandlung mit bakteriellem LPS bzw. durch eine vorangegangene *In vivo*-Infektion mit CVB3 in einen aktivierten Zustand versetzt wurden.
9. Nach einer Infektion von BALB/c-Mäusen mit CVB3 konnte nachgewiesen werden, dass auch unter *In vivo*-Bedingungen nur ein geringer Anteil der CD19⁺ B-Lymphozyten aus murinem Milzgewebe (max. 0,6-1 %; 3 d p. i.) infiziert ist.
10. Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Pan-Caspase-Inhibitoren – Z-VAD-FMK und Q-VD-OPH – konnte *in vitro* eine starke Abhängigkeit der in CVB3-infizierten murinen und humanen CD19⁺ B-Lymphozyten stattfindenden viralen Vermehrung von Caspase-vermittelten apoptotischen Prozessen belegt werden.
11. Durch die *In vivo*-Applikation der Pan-Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK bzw. Q-VD-OPH während einer akuten CVB3-Infektion immunkompetenter BALB/c-Mäuse konnte sowohl eine Senkung der Viruslast in Herz- und Milzgewebe als auch eine starke Reduktion des Anteils infizierter CD19⁺ B-Lymphozyten erreicht werden, was die Bedeutung apoptotischer Prozesse bei der Pathogenese einer CVB3-Infektion verdeutlicht.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

- Henke A, **Jarasch N**, and Wutzler P. (2003) Vaccination procedures against Coxsackievirus-induced heart disease. *Expert Rev Vaccines*, 2(6): 805-15
- **Jarasch N**, Martin U, Kamphausen E, Zell R, Wutzler P, and Henke A. (2005) Interferon- γ -induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Viral Immunology*, 18(2):355-64
- **Jarasch N**, Martin U, Zell R, Wutzler P, and Henke A. (2007) Influence of pan-caspase inhibitors on coxsackievirus B3-infected CD19⁺ B lymphocytes. *Apoptosis*, 12(9):1633-43
- Martin U, **Jarasch N**, Nestler M, Rassmann A, Munder T, Seitz S, Zell R, Wutzler P, and Henke A (2007) Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3. *Apoptosis*, 12(3):525-33
- Rassmann A, Henke A, **Jarasch N**, Lottspeich F, Saluz H-P and Munder T. (2007) The fatty acid synthase is a therapeutic target of coxsackievirus B3-induced disease. *Antiviral Research*, 76(2): 150-8
- Henke A, **Jarasch N**, Martin U, Wegert J, Wildner A, Zell R, and Wutzler P. (2008) Recombinant coxsackievirus vectors for prevention and therapy of virus-induced heart disease. *Int J Med Microbiol.*, 298(1-2):127-34.
- Henke A, **Jarasch N**, Martin U, Zell R, and Wutzler P. (2008) Characterization of the Protective Capability of a Recombinant Coxsackievirus B3 Variant Expressing Interferon-gamma. *Viral Immunol.*, 21(1):38-48.
- Henke A, **Jarasch N**, and Wutzler P. (2008) Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Exp. Rev. Vacc.*, 7(10):1557-67.
- Wiesener N, Zimmer C, **Jarasch N**, Wutzler P, and Henke A. (2009) Therapy of experimental influenza virus infection in mice with pyrrolidine dithiocarbamate. *Antiviral Res.*, submitted.
- **Jarasch N**, Zell R, Wutzler P, and Henke A. (2009) Antibody-dependent enhancement of CVB3 infectivity in primary CD19⁺ B lymphocytes. *J. Infect. Dis.*, submitted

Posterpräsentationen

EUROPIC meetings (European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses)

▪ **Lunteren 2005 (Niederlande)**

Jarasch N, Martin U, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Interferon- γ -induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. **(POSTERPREIS)**

Henke A, Martin U, **Jarasch N**, Wegert J, Zell R, Stelzner A, and Wutzler P. Pathogenic effects and host cell reactions during coxsackievirus B3 infection: how to decrease replication by targeting viral proteases.

Martin U, Nestler M, Munder T, Seitz S, **Jarasch N**, Wutzler P, and Henke A. Influence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK on the pathogenesis of coxsackievirus B3.

▪ **Saariselkä 2006 (Finnland)**

Jarasch N, Martin U, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Influence of pan-caspase inhibitors on productively coxsackievirus B3-infected CD19⁺ B lymphocytes.

Annual meetings of the German Society of Virology

▪ **Tübingen 2004**

Jarasch N, Martin U, Urban H, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Direct nitric oxide-mediated reduction of viral replication caused by a recombinant coxsackievirus B3.

▪ **München 2006**

Jarasch N, Martin U, Zell R, Wutzler P, and Henke A. In vitro and in vivo characterization of coxsackievirus B3-infected murine and human B cells.

Martin U, Nestler M, Munder T, **Jarasch N**, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Effect of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK on the viral proteases 2A and 3C and the replication of coxsackievirus B3 (CVB3).

▪ **Heidelberg 2008**

Jarasch N, Martin U, Wiesener N, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Experimental coxsackievirus B3 infection of primary murine and human CD19⁺ B lymphocytes: mode of action.

Wiesener N, Schütze T, **Jarasch N**, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Experimental studies on prevention and therapy of influenza A viral infections.

1. *Leipziger Human- und Tiermedizin-Symposium Infektion und Immunität*

▪ **Leipzig 2008**

Jarasch N, Martin U, Wiesener N, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Experimental coxsackievirus B3 infection of primary murine and human CD19⁺ B lymphocytes: mode of action.

Wiesener N, Schütze T, **Jarasch N**, Zell R, Wutzler P, and Henke A. Experimental studies on prevention and therapy of influenza A viral infections.

Vorträge

EUROPIC meeting (European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses)

▪ **Sitges (Spanien) 2008**

“Experimental Coxsackievirus B3 Infection of Primary Murine and Human CD19⁺ B Lymphocytes: Mode of Action”

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadine Jarasch
Anschrift: Lutherstraße 65
07743 Jena

Geburtstag/-ort: 13.10.1979, Leipzig
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulausbildung

1986-1992 Friedrich Wolf Oberschule in Ebersdorf/Thür.
1992-1998 Christian Gottlieb Reichard Gymnasium in Lobenstein/Thür
Schulabschluss: Abitur (1,4)

Hochschulstudium

1998-2004 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Vordiplom: 2000 (1,4)

Hauptfach: Mikrobiologie (1,0)
1. Nebenfach: Medizinische Mikrobiologie (1,0)
2. Nebenfach: Anthropologie (1,0)

Diplomarbeit: „Zytokin-induzierte Freisetzung von Stickoxid mittels
rekombinanter Coxsackieviren“
(Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena)

Hochschulabschluss: Diplom (1,0)

Forschungstätigkeit

Dissertation 02/2004 - 04/2005 Graduiertenstipendium des Landes Thüringen
05/2005 - 12/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die aktuelle Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

Jena, den 09.02.2009

.....

Nadine Jarasch